
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ELÉCTRICO SOBRE EL METABOLISMO DE
Aspergillus niger EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

INÉS MENDOZA ORTIZ

DIRECTOR

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

ASESORES

DRA. LAURA J. PERÉZ FLORES

DR. IGNACIO GONZÁLEZ MARTÍNEZ

MÉXICO, D.F., OCTUBRE 2006

COMITÉ TUTORIAL

Director

Dr. Ernesto Favela Torres
Profesor Titular "C"
Departamento de Biotecnología
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
favela@xanum.uam.mx

Asesora

Dra. Laura Josefina Pérez Flores
Profesor Titular "C"
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
ljpf@xanum.uam.mx

Asesor

Dr. Ignacio González Martínez
Profesor Titular "C"
Departamento de Electroquímica
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
igm@xanum.uam.mx

Este trabajo fue realizado en la Planta Piloto de Fermentaciones en Medio Sólido del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa está evaluada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrado del CONACyT (C/PFPN-2002-35-32).

La Maestría en Biología Experimental fue apoyada por la beca otorgada durante el periodo 2004-2005 por parte de CONACyT con el No. de registro 185599.

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada”:

“Evaluación del efecto electroquímico sobre el metabolismo de *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido”

JURADO DE EXÁMEN

Presidente

Dr. Ignacio González Martínez

Departamento de Electroquímica
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal

Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Secretario

Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldivar

Facultad de Química
Departamento de Química Inorgánica
Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

Nunca he encontrado un hombre de quien no haya aprendido algo!...

A los profesores y amigos...**Neto, Nachito y Laura**...Gracias por involucrarme en este camino tan maravilloso...por enseñarme la importancia de la perseverancia, disciplina, responsabilidad y constancia...por el trabajo y tiempo brindado...y por los comentarios tan oportunos en la realización de este escrito...

Hay quien dice que la mejor compañía es ser uno mismo...pero con quién se compartirían tantas experiencias?...

A los compañeros y amigos de la planta piloto 4; a los ausentes y a los que aun están...Gracias por hacer con su compañía aun más agradable esta historia...

En algo estoy de acuerdo; la AMISTAD es un milagro!...

A **Vara**...Gracias amiga por hacerme con tu cariño...mucho más fácil el camino...por darme ocasión de darte algunas veces, algo de mi misma...haciéndote sentir...que me eres importante!...

“El amigo ha de ser como la sangre, que acude luego a la herida sin esperar a que la llamen”

A mis compañeros y amigos de la maestría...**Armando, Elsa, Ángeles, Gabriel y Xochil**...Gracias por todas las experiencias compartidas en esta aventura que iniciamos juntos...

A todos aquellos seres que alegran mi vida cada día...

*A mis **PADRES***

Toda la vida...

“No basta dar pasos que un día puedan conducir hasta la meta, sino que cada paso ha de ser una meta, sin dejar de ser un paso”

CONTENIDO

Índice de contenido	i
Índice de tablas y figuras	iii
Resumen	vi
Abstract	viii
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Revisión bibliográfica	4
Capítulo 3. Justificación	11
Capítulo 4. Hipótesis	13
Capítulo 5. Objetivos	13
5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos particulares.....	13
Capítulo 6. Materiales y Métodos	14
6.1 Voltamperometría cíclica.....	15
6.2 Potencial de celda.....	16
6.3 Microorganismo.....	17
6.4 Condiciones de cultivo.....	17
6.4.1 Medio de conservación y propagación.....	17
6.4.2 Propagación de la cepa.....	18
6.5 Fermentación en medio sólido (FMS).....	18
6.5.1 Soporte y tratamiento.....	18
6.5.2 Medio de cultivo para la FMS.....	19
6.5.3 Inóculo.....	20
6.5.4 Condiciones de fermentación.....	21
6.5.5 Fermentación en reactores en columnas.....	21
6.5.6 Fermentaciones en el reactor electroquímico.....	22
6.6 Aplicación del potencial eléctrico.....	23
6.7 Métodos analíticos.....	24
6.7.1 Análisis de CO ₂ y determinación de los parámetros cinéticos.....	24
6.7.2 Actividad enzimática.....	25

6.7.3 Consumo del sustrato.....	26
6.8 Variables fisicoquímicas.....	27
6.8.1 Determinación de pH y conductividad eléctrica.....	27
6.8.2 Determinación de humedad y actividad de agua.....	27
6.9 Análisis estadístico.....	27
Capítulo 7. Resultados y Discusión.....	29
7.1 Caracterización y estandarización del proceso de FMS.....	29
7.1.1 Efecto del contenido de humedad inicial sobre el crecimiento y la producción de invertasa de <i>A. niger</i>	32
7.1.1.1 Producción de CO ₂	33
7.1.1.2 Producción de invertasa.....	36
7.1.1.3 Conclusiones parciales.....	42
7.2 Estudio electroquímico del reactor.....	43
7.2.1 Caracterización voltamperométrica de los electrodos.....	43
7.2.2 Potencial de celda (reactor electroquímico).....	44
7.2.3 Conclusiones parciales.....	48
7.3 Efecto de la aplicación del potencial eléctrico sobre el metabolismo de <i>A. niger</i>	49
7.3.1 Efecto de la aplicación del potencial eléctrico a voltaje-corriente variable y voltaje constante sobre el crecimiento de <i>A. niger</i>	49
7.3.1.1 Producción de CO ₂	49
7.3.1.2 Fase de germinación.....	53
7.3.1.3 Tasa específica de crecimiento.....	54
7.3.1.4 Producción de invertasa.....	56
7.3.1.5 Azúcares reductores.....	61
7.3.1.6 Factores fisicoquímicos que influyen en el crecimiento de <i>A.</i> <i>niger</i> bajo el estímulo de un potencial eléctrico.....	64
Capítulo 8. Conclusiones.....	69
Capítulo 9. Literatura citada.....	72
ANEXOS.....	79

Índice de tablas y figuras

Tabla 1	Composición del medio de cultivo Pontecorvo (ATCC medio 687) concentrado con sacarosa como única fuente de carbono.....	19
Tabla 2	Composición de la disolución de elementos traza.....	20
Tabla 3	Valores de pH y conductividad eléctrica al inicio de la fermentación.....	39
Tabla 4	Valores de actividad de agua (a_w) y contenido de humedad al inicio de la fermentación.....	41
Figura 1	Diagrama del diseño experimental.....	15
Figura 2	Celda electroquímica.....	16
Figura 3	Esquema del sistema experimental.....	22
Figura 4	Producción de invertasa por <i>A. niger</i> en reactores en columna con sacarosa como única fuente de carbono (200 mg/gss) a 30°C (ensayos realizados por triplicado).....	30
Figura 5	Velocidad máxima de producción de CO ₂ por <i>A. niger</i> a 35 h de cultivo con diferentes contenidos de humedad inicial del soporte (ensayos realizados por triplicado).	34
Figura 6	Producción de CO ₂ total por <i>A. niger</i> a 35 h de cultivo con diferentes contenidos de humedad inicial del soporte (ensayos realizados por triplicado).....	35

Figura 7	Producción de invertasa por <i>A. niger</i> a 35 h de cultivo con sacarosa como única fuente de carbono (200 mg/gss) con diferentes contenidos de humedad inicial	37
Figura 8	Valores de pH y conductividad eléctrica al final del cultivo (35 h) con diferentes contenidos de humedad inicial.....	39
Figura 9	Valores de actividad de agua (a_w) y contenido de humedad al final del cultivo (35 h) con diferentes contenidos de humedad inicial.....	41
Figura 10	Voltamperograma cíclico para una disolución de ácido perclórico (0.2M) utilizando un electrodo de titanio recubierto con óxido de rutenio, intervalo de potencial de +0.8 V a -1.0 V.....	44
Figura 11	Potencial de celda obtenida al aplicar diferentes intensidades de corriente (mA/cm^2) en el reactor electroquímico, con 45 y 55 % de humedad inicial en el soporte.....	46
Figura 12	Fundamento electroquímico del reactor; electrodos de titanio recubiertos con óxido de rutenio (área 35 cm^2).....	48
Figura 13	Velocidad máxima de producción de CO_2 por <i>A. niger</i> a 35 h, en función del potencial eléctrico aplicado a voltaje-corriente variable y voltaje constante.....	51
Figura 14	Producción de CO_2 total por <i>A. niger</i> a 35 h de cultivo, en función del potencial eléctrico aplicado a voltaje-corriente variable y voltaje constante.....	52
Figura 15	Duración de la fase de germinación (<i>lag</i>) de <i>A. niger</i> a 35 h de cultivo, en función del potencial eléctrico aplicado a voltaje-corriente variable y voltaje constante.....	53

Figura 16	Tasa específica de crecimiento de <i>A. niger</i> a 35 h de cultivo, en función del potencial aplicado a voltaje-corriente variable y voltaje constante.	55
Figura 17	Producción de invertasa por <i>A. niger</i> a 35h de cultivo, en función del potencial aplicado a voltaje-corriente variable y voltaje constante.....	56
Figura 18	Valores de pH final del cultivo (35 h), en función del potencial eléctrico aplicado a voltaje-corriente variable y voltaje constante.....	59
Figura 19	Concentración final de azúcares reductores, en función del potencial aplicado a voltaje-corriente variable (concentración inicial de sacarosa, 200 mg/gss; 55 % humedad y 35 h de cultivo).....	62
Figura 20	Concentración final de azúcares reductores, en función del potencial aplicado a voltaje constante (concentración inicial de sacarosa, 200 mg/gss; 55 % humedad y 35 h de cultivo).....	63
Figura 21	Valores de conductividad eléctrica (mS/cm^2) al final del cultivo (35 h), en función del potencial eléctrico aplicado a voltaje-corriente variable y voltaje constante.....	65
Figura 22	Valores de actividad de agua (a_w) al final del cultivo (35 h), en función del potencial eléctrico aplicado a voltaje-corriente variable y voltaje constante.....	66
Figura 23	Contenido de humedad (%) al final del cultivo (35 h), en función del potencial eléctrico aplicado a voltaje-corriente variable y voltaje constante.....	68

RESUMEN

Aspergillus niger es un tipo de hongo filamentoso quimioheterotrófico que tolera y se desarrolla en condiciones variables de acidez, humedad y temperatura, en dichas condiciones sobrevive secretando enzimas que degradan una gran variedad de sustratos orgánicos que emplean como nutrientes (Moore-Landecker, 1996). Tal es el caso de la invertasa, enzima que hidroliza la sacarosa (Gracida-Rodríguez *et al.*, 2004).

Dado el amplio interés biotecnológico de *A. niger* (Bennett y Klich, 1992), se han buscado nuevas alternativas biotecnológicas que promuevan sus capacidades fisiológicas. Es por ello, que el presente trabajo tuvo como finalidad aplicar y evaluar como alternativa biotecnológica, la aplicación de potenciales eléctricos de baja magnitud durante el crecimiento de *A. niger* y la producción de invertasa en la fermentación en medio sólido, evaluando aquellos parámetros de crecimiento y del metabolismo que pudiesen afectarse. Así como también enriquecer el conocimiento acerca de la aplicación de esta tecnología sobre este tipo de microorganismos, ya que en la literatura sólo se refleja el estudio sobre líneas celulares.

Se estandarizaron las condiciones de ensayo del proceso de fermentación en medio sólido (FMS) y se establecieron las condiciones electroquímicas de operación del reactor. Se evaluó el efecto de la aplicación de una serie de potenciales eléctricos (voltaje-corriente variable y voltaje constante) sobre el crecimiento de *A. niger*, producción de invertasa e hidrólisis de sacarosa como única fuente de carbono. Como un método indirecto para la evaluación del crecimiento, se midió el CO₂ por espectrometría infrarroja. Por otro lado, para la evaluación de la producción de la enzima, e hidrólisis del sustrato, se realizó la cuantificación de los azúcares reductores liberados por espectrofotometría y cromatografía líquida de alta resolución, respectivamente.

Se observó que al aplicar un potencial eléctrico, tanto a **voltaje-corriente variable** (10.5-15.5 V), como a **voltaje constante** (2.5-10.5 V), la velocidad de producción de CO₂ disminuye ligeramente al incrementar el potencial eléctrico en dichos intervalos. La fase de germinación *lag*, y la tasa específica de crecimiento μ de *A. niger* no presentan cambios favorables.

La cepa de *A. niger* fue capaz de producir extracelularmente la invertasa (β -D-fructofuranosidasa) al someterla a un cultivo con sacarosa como única fuente de carbono, en presencia de potenciales eléctricos de baja magnitud y con diferentes contenidos de humedad 45-60 %. La mayor actividad enzimática determinada para la mayoría de los casos fue de 15 UI/gss (unidades internacionales por gramo de soporte seco). La aplicación de potenciales eléctricos de baja magnitud no favorece la producción de la enzima invertasa, pero si su actividad catalítica, lo que conduce a un mayor grado de **hidrólisis de sacarosa** y a la mayor acumulación de azúcares reductores, bajo las condiciones de estudio.

ABSTRACT

Aspergillus niger is a quimioheterotrophic filamentous fungi that tolerates and grows in extreme conditions of acidity, moisture and temperature, in these conditions, it survives secreting enzymes, that degrade a great variety of organic substrates, served as nutrients (Moore-Landecker, 1996). So it's the case of invertase, hydrolyze sucrose enzyme (Gracida-Rodriguez *et al.*, 2004).

Given the biotechnological interest of *A. niger* (Bennett and Klich, 1992), new biotechnological alternatives have looked for promote its physiological capacities. For that reason, the goal of the present project was to evaluate the effect of application of low-intensity electrical potentials on growth of *A. niger* and the invertase production in solid state fermentation. Moreover, it is desired to contribute to the understanding of the behavior of filamentous fungi upon such new technology, since its use has only been reported on cell lines.

The conditions of the solid state fermentation (SSF) process were standarized, as well as the electrochemical conditions for the operation of the reactor. The treatment of the fermentation medium with a series of electrical potentials (both variable voltage-current, and constant voltage) were tested to evaluate the growth of *A. niger*, invertase production and hydrolysis of sucrose using sucrose as sole carbon source. Infrared spectrometry was used to measure CO₂ evolution as an indirect method for the evaluation of growth. The evaluation of the production of enzyme and of the hydrolysis of substrate was done using spectrophotometry and HPLC techniques, respectively, by measuring liberated reducing sugars.

The strain *A. niger* presented extracellular invertase (β -D-fructofuranosidase) when subjected to sucrose as sole carbon source, in the presence of low intensity electrical potentials (0-15.5 V), and under various levels of humidity (45 to 60 %). The highest enzymatic activity was found to be 15 UI/gss.

The rate of CO₂ production slightly decreases as the electrical potential increased. This behavior was observed both, under **variable voltage-current** (magnitude range of 10.5-15.5 V), and under **constant voltage** (magnitude interval of 2.5 to 10.5 V). The **lag** phase and the specific growth rate of *A. niger* were not stimulated under any treatment. The production of invertase decreases as the electrical potential increased in such intervals. However, the hydrolysis of sucrose is enhanced up to a 100 % conversion.

Under the conditions evaluated, the use of low intensity electrical potentials does not stimulate the production of the enzyme invertase. However its catalytic activity is increased to a larger degree of sucrose hydrolysis and to the major accumulation of reducing sugars.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos son organismos eucarióticos, que toleran y se desarrollan en condiciones variables de acidez, humedad y temperatura. Se encuentran en una gran variedad de ambientes naturales como suelo, residuos orgánicos, entre otros, también pueden encontrarse como organismos patógenos en animales y plantas. Debido a su extraordinaria capacidad metabólica, son potenciales productores de metabolitos primarios y secundarios, y de enzimas intracelulares y extracelulares de importancia biotecnológica (Onions *et al.*, 1981).

Aspergillus niger es un hongo filamentoso quimioheterotrófico que sobrevive secretando enzimas que degradan una gran variedad de sustratos orgánicos complejos a sustancias simples que emplean como nutrientes (Moore-Landecker, 1996). Tal es el caso de la invertasa (β -D-fructofuranosidasa), enzima que hidroliza la sacarosa en una mezcla equimolar de fructosa y glucosa (Gracida-Rodríguez *et al.*, 2004).

Dado el amplio interés biotecnológico de *A. niger*, tanto en el área industrial como ambiental (Bennett and Klich, 1992), se han buscado nuevas alternativas biotecnológicas que promuevan sus capacidades fisiológicas. Una de ellas es la aplicación de potenciales eléctricos. Se han realizado pruebas a nivel de biología molecular, en las que se demuestran que los potenciales eléctricos pueden afectar

las funciones biológicas de los organismos, debido a cambios en la actividad enzimática, en el transporte de iones a través de la membrana celular (García-Sancho *et al.*, 1994; Panagopoulos *et al.*, 2000), en la concentración de hormonas, o cambios en la síntesis o transcripción del ARN (Tenforte, 1991; Strasák *et al.*, 2002; Teissié *et al.*, 2002).

Se ha demostrado también que la aplicación de potenciales eléctricos crean alteraciones en los microorganismos (bacterias y levaduras, principalmente) que pueden ser irreversibles, debido a que no sólo actúan a nivel de membrana celular, si no también lo hacen sobre la pared celular (Teissié *et al.*, 2002). Sin embargo, existen ventajas de su aplicación, como la activación de poblaciones microbianas (hongos filamentosos y bacterias) que trae como consecuencia un incremento en el crecimiento y en la actividad metabólica (Tenforte, 1991; Van Cauwenberghe, 1997; Strasák *et al.*, 2002; Mendoza *et al.*, 2003).

Se ha postulado que debido a su localización a nivel de membrana celular, los procesos de transducción de señales son modificados por potenciales eléctricos. Estas señales regulan procesos intracelulares, como la actividad metabólica, la expresión génica, la diferenciación y la proliferación celular. Otra posible modificación que el potencial eléctrico puede ocasionar, es la activación de proteína-cinasas, las cuales son responsables del inicio de muchas funciones celulares, como por ejemplo, la activación de otras enzimas celulares y la proliferación celular. Se ha demostrado que la aplicación de potenciales eléctricos aumentan la actividad de estas proteínas en células linfoides (Uckun *et al.*, 1995).

A pesar de todos los antecedentes encontrados, no se ha logrado una comprensión de los fenómenos fisiológicos que ocurren en este tipo de procesos, además de la carencia de estudios referentes a la aplicación de un potencial eléctrico sobre los hongos filamentosos. Es por ello, que el presente trabajo pretende no sólo evaluar el impacto del proceso electroquímico sobre el metabolismo de un hongo filamentoso

de importancia biotecnológica como *A. niger*, sino además, aportar con ello los posibles procesos fisiológicos que pudiesen afectarse, proponiendo así algunas condiciones útiles para su aplicación en esta área.

El presente trabajo describe el efecto de la aplicación de potenciales eléctricos de baja magnitud sobre el crecimiento de *A. niger* y sobre la producción de invertasa e hidrólisis de sacarosa, en cultivos en medio sólido empleando agrolita como soporte inerte.

En el siguiente capítulo se presenta una revisión bibliográfica relacionada con el efecto del potencial eléctrico (en diferentes modalidades) sobre diversas líneas celulares, haciendo hincapié en el efecto sobre algunas de sus estructuras celulares y moleculares. También se presenta la revisión de las principales características de la fermentación en medio sólido en el crecimiento y producción de invertasa por *A. niger* y los factores que influyen en su desarrollo.

De esta revisión surgen los objetivos e hipótesis planteados para este trabajo; posteriormente, se describe la metodología empleada para el cumplimiento de dichos objetivos; en ella se incluye la descripción del microorganismo utilizado, del sustrato y de los sistemas de fermentación, así como las técnicas y procedimientos empleados en la medición de las variables relevantes. El capítulo que corresponde a los resultados y discusión del trabajo experimental, se divide en tres partes principales; 1) caracterización y estandarización del proceso de FMS, 2) caracterización voltamperométrica de los electrodos y el análisis electroquímico del soporte de fermentación en el reactor y 3) el metabolismo de la sacarosa y producción de invertasa por *A. niger* en ausencia y presencia de un potencial eléctrico. Finalmente, con base en el análisis de resultados y en la discusión de los mismos, se presentan las conclusiones pertinentes, así como la literatura relacionada con este trabajo.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Durante mucho tiempo los hongos fueron considerados organismos similares a las plantas, sin embargo, con su estudio al paso del tiempo, se identificaron diversas características morfológicas y fisiológicas que los hacen totalmente diferentes a otros organismos, por lo que actualmente están clasificados dentro de otro reino, el reino *fungi*. Este reino se encuentra conformado por una gran diversidad de organismos que, en base a sus características morfológicas, forma de reproducción y modo de crecimiento, se dividió en dos grandes grupos: hongos filamentosos y hongos levaduriformes. Debido a su importancia médica e industrial y a su gran abundancia, los hongos filamentosos han sido los más ampliamente estudiados.

Los hongos filamentosos se reproducen por medio de esporas de forma sexual o asexual, se encuentran en una gran variedad de ambientes naturales como suelo, residuos orgánicos, entre otros, por lo que se les considera organismos cosmopolitas. También pueden encontrarse como organismos patógenos en animales y plantas debido a su extraordinaria capacidad metabólica, ya que poseen una gran cantidad de vías catabólicas (Onions *et al.*, 1981).

Fisiológicamente, los hongos filamentosos se adaptan a condiciones más severas, que otros microorganismos, ya que toleran y se desarrollan en medios de acidez variable; sin embargo, el pH óptimo para casi todas las especies es de 5-6 unidades. Aunque requieren agua para su desarrollo, pueden sobrevivir en ambientes con un

bajo contenido de humedad. Se desarrollan en condiciones de temperatura muy variadas, pero la óptima está entre 28-30 °C, para la mayoría de las especies. En dichas condiciones, los hongos filamentosos son capaces de producir enzimas hidrolíticas de importancia biotecnológica, sobre todo en la industria de alimentos (Moore-Landecker, 1996). Tal es el caso de la invertasa (β -D-fructofuranosidasa fructohidrolasa), enzima que hidroliza la sacarosa, produciendo una mezcla equimolar de fructosa y glucosa. Dicha mezcla tiene un poder edulcorante mayor al de la sacarosa, por lo que es ampliamente utilizada en el área alimentaria, principalmente en la producción de chocolate, mermeladas, miel sintética, entre otros (Gracida-Rodríguez *et al.*, 2004).

Para la producción industrial de la invertasa se utilizan principalmente cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, así como cepas del género *Aspergillus*, como *A. niger*, *A. oryzae* y *A. ficcum* (Peberdy, 1993; James and Simpson, 1996). En estos hongos filamentosos, la actividad de invertasa se encuentra intracelular y extracelularmente. En *A. niger*, se ha observado que aproximadamente del 40-46 % de esta enzima es intracelular (Vainstein and Peberdy, 1991; Peberdy, 1993).

El género *Aspergillus* es un tipo de hongo filamentosos que pertenece a la clase *Deuteromyceta*, está conformado por aproximadamente 900 especies, entre las que se encuentra *Aspergillus niger*. Este es un organismo quimioheterotrófico, ya que obtiene los nutrientes que requiere de sustancias químicas complejas presentes en la naturaleza; además de que sobrevive secretando enzimas que degradan una gran variedad de sustratos orgánicos complejos a sustancias simples, que emplean como nutrientes; también poseen una cobertura externa de mucus (matriz extracelular) compuesta principalmente por polisacáridos que provocan que las células se adhieran entre sí. Esta cobertura no tiene efecto relevante sobre la permeabilidad de la pared o de la membrana, pero sí tiene un papel importante en la proliferación del hongo, impidiendo que se disperse en el medio (Raper and Fennell, 1965).

El metabolismo primario de *A. niger*, al igual que el de la mayoría de los microorganismos, comprende una serie interrelacionada de enzimas que controlan las vías catabólicas y anabólicas, en las que la glucólisis y el ciclo de Krebs, constituyen la parte central del metabolismo celular, del cual se ramifican funciones biosintéticas y catabólicas específicas, suministrando así la energía necesaria. El metabolismo secundario se presenta sólo cuando el crecimiento es limitado, por lo que generalmente ocurre en la fase tardía del crecimiento. Durante esta fase se sintetizan los metabolitos secundarios, los cuales, aunque no son esenciales para el crecimiento del hongo, tienen al igual que muchas enzimas gran importancia biotecnológica (Moore-Landecker, 1996).

La pared celular es un componente importante y constituye del 15 al 30 % del peso seco del hongo, ofrece rigidez y protege a la membrana celular del choque osmótico. El 80 % de la pared celular consiste de carbohidratos, los más abundantes son quitina, quitosano, glucano y manano. Aproximadamente el 10 % de la pared celular consiste de proteínas y glicoproteínas, así como enzimas involucradas en su crecimiento (Moore-Landecker, 1996).

Al igual que todos los organismos eucariontes, la estructura fundamental de la membrana celular de los hongos filamentosos consiste en una bicapa lipídica, formada principalmente por una variedad de moléculas de fosfolípidos, los más abundantes son: fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina; además de contener grandes cantidades de proteínas y esteroides como el ergosterol (Moore-Landecker, 1996).

La función principal de la membrana es regular el transporte de diversos compuestos en la célula, las proteínas como las permeasas juegan un papel fundamental, regulando la entrada y salida de materiales. Los esteroides, por tratarse de moléculas anfipáticas, cubren una función de restricción o selección, es decir, pueden atraer o repeler moléculas, facilitando o impidiendo su interacción con las proteínas de la membrana. El ergosterol es el principal esteroide en la membrana de los hongos y

juega el mismo papel que el colesterol en la mayoría de las membranas plasmáticas (Martínez *et al.*, 1998).

La membrana plasmática actúa como soporte de un gran número de estructuras moleculares como los canales iónicos, los receptores químicos, los transportadores, las bombas iónicas, las enzimas que generan segundos mensajeros, las proteínas de reconocimiento, las proteínas que sirven de soporte a elementos del citoesqueleto, etc. La membrana plasmática se caracteriza por estar polarizada eléctricamente, ya que en estado de reposo, su lado interno está cubierto por una nube de cargas negativas, mientras que su exterior lo está de cargas positivas. Por su composición lipídica, la membrana impide el paso a través de ella a moléculas hidrofílicas y/o aquéllas que tengan cargas eléctricas (iones). Sin embargo, se comporta como una membrana semipermeable selectiva frente a este tipo de sustancias (Lodish *et al.*, 2003).

El paso de iones en la membrana celular se hace a través de proteínas-canales, que son reguladas por señales químicas o por cambios en la diferencia de voltaje que caracteriza a la membrana, el cual, se mantiene en equilibrio por el trabajo de las bombas iónicas (bomba de Na^+/K^+ , bomba de Ca^{2+}) (Lodish *et al.*, 2003). En condiciones fisiológicas normales, el potencial eléctrico en la membrana (potencial de membrana) varía entre 20-200 mV dependiendo del tipo celular (Panagopoulos *et al.*, 2000). Cuando se aplica un potencial eléctrico por encima de este valor, la membrana presenta cambios que producen variadas respuestas bioquímicas y fisiológicas, las cuales conllevan al incremento de la conductancia y de la permeabilidad. Este efecto de permeabilización provoca la inducción de poros no selectivos en la membrana celular, de forma transitoria y reversible, sin afectar la viabilidad celular (Teissié *et al.*, 2002).

Investigadores de diversas áreas (principalmente del área médica) se han valido de las propiedades de la membrana plasmática y las han combinado con la aplicación

de factores físicos externos (potenciales eléctricos) para la estimulación de procesos fisiológicos y con ello la creación de alternativas médicas e industriales. Sin embargo, a pesar del amplio uso del potencial eléctrico sobre muchos modelos de estudio (principalmente líneas celulares), uno de los problemas actualmente más discutidos en el área de la biofísica, sigue siendo sin duda, si un potencial eléctrico externo puede afectar a los sistemas vivos. A partir de esta hipótesis, se han realizado diversos estudios centrados principalmente a nivel de biología celular.

A pesar del gran número de estudios que demuestran algún efecto del potencial eléctrico sobre varios modelos, la mayoría de ellos sólo son descriptivos, y no profundizan sobre su efecto a nivel de la fisiología celular y/o molecular. A continuación se revisan algunos de los principales aspectos sobre los que se han centrado los estudios experimentales del efecto de potenciales eléctricos sobre la fisiología celular, en diversos modelos experimentales, como son: líneas celulares y algunas bacterias.

Algunos de los estudios demuestran que un potencial eléctrico externo puede afectar las funciones biológicas de los organismos (Tenforte, 1991; Lacy-Hulbert *et al.*, 1998; Strasák *et al.*, 2002; Teissie *et al.*, 2002;). Se ha postulado que los microambientes que se crean en el interior de las membranas celulares o en las zonas hidrofóbicas de ciertas proteínas (enzimas, transportadores), restringen la movilidad de las biomoléculas y disminuyen la velocidad de las reacciones químicas, haciéndolas más susceptibles a interaccionar con un potencial eléctrico externo (García-Sancho *et al.*, 1994). Podrían así, generarse modificaciones de la expresión génica, de las reacciones metabólicas, de los sistemas de señales intracelulares o la permeabilidad de las membranas biológicas, que podrían dar lugar a modificaciones de las funciones celulares, como son: cambios en la concentración de hormonas, cambios en la actividad de enzimas, en el transporte de iones a través de la membrana celular, y cambios en la síntesis o transcripción de ARN (Tenforte, 1991; Strasák *et al.*, 2002).

Se ha demostrado, que el potencial eléctrico externo provoca alteraciones en los microorganismos que pueden ser irreversibles, debido a que no solo actúa a nivel de membrana, también lo hace sobre la pared celular (Teissié *et al.*, 2002). Se ha demostrado también que potenciales eléctricos de baja magnitud traen como consecuencia un incremento en el crecimiento y en la actividad metabólica de los microorganismos (Van-Cauwenberghe, 1997; Teissié *et al.*, 2002).

Los procesos de transducción de señales son modificados por potenciales eléctricos externos y han sido objeto de particular atención, ya que las membranas celulares presentan para éstos una barrera importante, y en ellas pueden darse interacciones especiales con las biomoléculas (Lacy-Hulbert *et al.*, 1998). La transducción de señales sucede en sistemas moleculares localizados en las membranas celulares y dentro de las células. Estas señales regulan procesos intracelulares tales como la actividad metabólica, la expresión génica, la diferenciación y la proliferación celular (Alberts *et al.*, 2002).

Por otro lado, el aumento de Ca^{2+} intracelular, producido por su entrada a través de canales de la membrana plasmática, es una señal que inicia muchas respuestas celulares. Por este motivo, se han realizado diversos estudios acerca del efecto del potencial eléctrico sobre esta vía de señalización. Algunos grupos de investigación han propuesto que la aplicación de un potencial eléctrico externo es capaz de producir una señal de Ca^{2+} en los linfocitos, lo que podría iniciar fenómenos de activación o proliferación celular (Lindstrom *et al.*, 1993; Lindstrom *et al.*, 1995). Sin embargo, otros investigadores han encontrado resultados contradictorios (García-Sancho *et al.*, 1994).

Otro de los blancos de un potencial eléctrico en los que se han centrado diversos estudios es la activación de proteína-quinasas, las cuales son responsables de la iniciación de muchas funciones celulares, como por ejemplo, la activación de otras enzimas celulares, poniendo en marcha cascadas de activación que amplifican la

señal inicial. Se ha encontrado que la aplicación de un potencial eléctrico aumenta la actividad de estas cinasas (Uckun *et al.*, 1995; Kristupaitis *et al.*, 1998). Estas proteínas están directamente relacionadas con la proliferación celular, por lo que se esperaría que al aplicar un potencial eléctrico de cierta magnitud aumentara la proliferación celular. Sin embargo, se ha encontrado que el efecto es menor, aproximadamente entre el 10-20 %, por lo que se considera que no tiene un significado funcional importante (Portier and Wolfe, 1998).

Finalmente, en un estudio realizado por Strasák *et al.*, (2002), se evaluó el efecto de un campo magnético de $B_m = 2.7-10$ mT, $f = 50$ Hz con un tiempo de exposición de 0-12 min, sobre el crecimiento de *Escherichia coli*. Se observó que el campo magnético en un nivel alto (10 mT) no tuvo un efecto sobre las respuestas metabólicas de *E. coli*. Sin embargo, a valores bajos de intensidad (3 mT), se demostró que el número de bacterias se incrementó durante el tiempo de exposición de los cultivos.

Por otro lado, en un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo en el Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, se evaluó el efecto de diferentes potenciales eléctricos sobre el crecimiento de un hongo filamentoso (*A. niger*), se demostró que la aplicación de potenciales eléctricos de baja magnitud (5-12.5 V/ 0.8 mA), estimulan la producción de CO₂ (Mendoza *et al.*, 2003). En dicho estudio, la máxima producción de CO₂ se obtuvo al aplicar un potencial eléctrico de 12.5 V-0.8 mA y al aplicar 5 V se observó una estimulación en la fase de adaptación (*lag*).

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

3. JUSTIFICACIÓN

Los hongos filamentosos, principalmente del género *Aspergillus*, pertenecen a un grupo importante de microorganismos que ha llamado la atención de muchos investigadores, por su capacidad para degradar sustratos macromoleculares, especialmente carbohidratos y sustancias tóxicas, además de que han recibido particular atención para el enriquecimiento proteico de sustratos de almidón. Todos los productos enriquecidos con proteína son empleados como alimento y como complemento alimenticio para consumo animal (Bennett and Klich, 1992). Además las enzimas hidrolíticas producidas por microorganismos como *A. niger*, *A. oryzae*, *A. ficcum* son de gran valor para aplicaciones comerciales en el procesamiento de carbohidratos. Tal es el caso de la enzima invertasa (β -D-fructofuranosidasa fructohidrolasa) que tiene gran aplicación en la industria alimentaria (Gracida-Rodríguez *et al.*, 2004).

Dado el amplio interés biotecnológico de *A. niger*, se buscan nuevas estrategias tecnológicas que favorezcan sus capacidades fisiológicas. En este trabajo, se propone la aplicación de potenciales eléctricos, para favorecer el crecimiento y metabolismo de *A. niger*, y con ello incrementar la producción de invertasa.

A pesar de los antecedentes encontrados, no se ha logrado una comprensión de los fenómenos fisiológicos que ocurren en este tipo de procesos. Faltan estudios

referentes a la aplicación de potenciales eléctricos sobre los hongos filamentosos, por lo que este trabajo pretende evaluar el impacto del proceso electroquímico sobre el metabolismo de un hongo filamentoso de importancia biotecnológica como es *A. niger*, además de aportar conocimientos acerca de los posibles procesos fisiológicos probablemente afectados, proporcionando con ello algunas condiciones útiles para su aplicación en esta área.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

4. HIPÓTESIS

La aplicación permanente de un potencial eléctrico de baja magnitud en cultivos en fase sólida de *Aspergillus niger* estimula la fase de germinación (*lag*), la tasa específica de crecimiento (μ), así como la producción de invertasa.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un potencial eléctrico baja magnitud sobre el metabolismo de sacarosa por *Aspergillus niger*.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto del potencial eléctrico de baja magnitud, sobre la fase de germinación (*lag*) y la tasa específica de crecimiento (μ).
- Evaluar el efecto del potencial eléctrico de baja magnitud sobre la producción de invertasa, y el consumo de sacarosa.

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño experimental, se llevó a cabo en dos etapas (Fig. 1); una etapa abiótica y una biótica. En la primera etapa se realizó la caracterización electroquímica del reactor en ausencia de *A. niger*. Esta caracterización dependió de la naturaleza del soporte, de los componentes del medio de cultivo; así como de su concentración, del tipo de electrodos, y de la naturaleza y concentración de las soluciones electrolíticas.

La segunda etapa contempla la parte biótica (Fig. 1), dividida en dos fases, en la primera de ellas se estudió el metabolismo de *A. niger*, en ausencia de potenciales eléctricos. En esta etapa se establecieron las condiciones de estudio de la fermentación en medio sólido, así como también el tiempo de máxima de producción de CO₂, producción de invertasa y consumo de sacarosa. En la segunda etapa, se evaluó el efecto del potencial eléctrico sobre el metabolismo de *A. niger*. En ambas etapas, se determinaron como variables de respuesta: la producción de CO₂, la producción de invertasa, y el consumo del sustrato (sacarosa). Para llevar a cabo ambas etapas, se realizaron diversas metodologías descritas a continuación.

Cabe mencionar que previo al estudio electroquímico del reactor, se realizó la caracterización de los electrodos utilizados a partir de un barrido voltamperométrico de la superficie de óxido de rutenio soportado sobre titanio (electrodos de estudio).

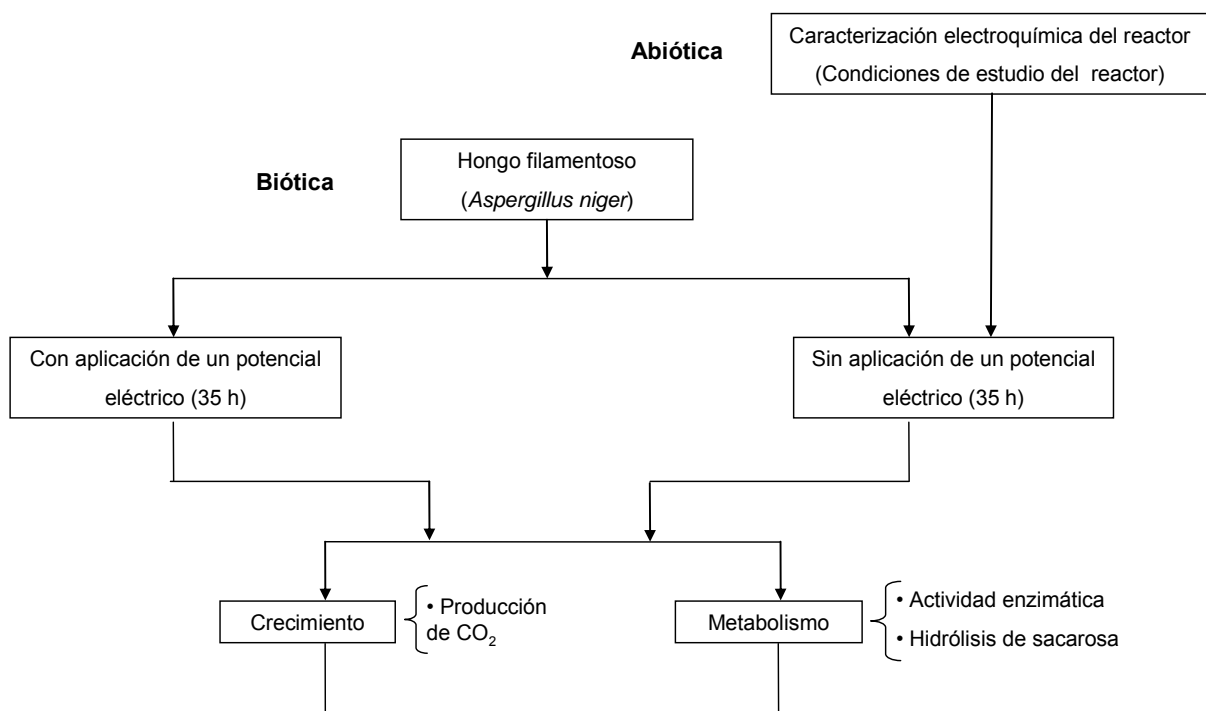


Figura 1. Diagrama del diseño experimental

6.1. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica es la técnica electroanalítica más versátil para el estudio de especies electroactivas. Esta técnica es una de las primeras pruebas aplicadas en un estudio electroquímico. Un voltamperograma es una curva de la variación de corriente, medida desde el electrodo de trabajo, contra el potencial aplicado durante el barrido (Evans *et al.*, 1983; Kissinger and Heineman, 1983). El voltaje aplicado al electrodo de trabajo varía en forma lineal con respecto al tiempo, desde un valor inicial hasta un potencial de inversión ($E \pm \lambda$).

En este estudio, se realizaron voltamperogramas en régimen de difusión estacionario (sin agitación), iniciando un barrido a diferentes potenciales de inversión tanto en dirección anódica como en dirección catódica. Estos estudios electroquímicos se llevaron a cabo en una celda de 100 mL, equipada con un electrodo de trabajo

(titanio recubierto con óxido de rutenio), un electrodo de referencia de sulfato de potasio saturado SSE (saturated sulphates electrode, cuyo $E^{\circ} = 0.641 \text{ V/ ENH}$, electrodo normal de hidrógeno) y como contraelectrodo, una barra de grafito (Fig. 2). Los potenciales son reportados con respecto al electrodo de sulfatos saturado.

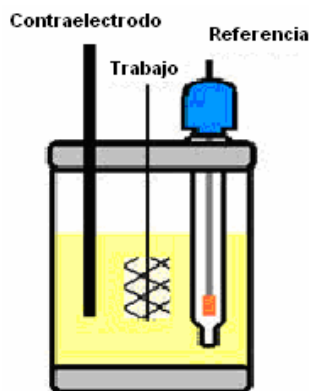


Figura 2. Celda electroquímica.

Se realizaron las mediciones electroquímicas usando un Potenciostato/Galvanostato modelo PAR 273A que requiere de una interfase conectada a una computadora que realiza la adquisición y análisis de datos con el programa M270. Las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente en soluciones previamente preparadas de HClO_4 0.1 M (ácido perclórico). Se estudiaron los procesos de oxidación y reducción del óxido de rutenio (RuO_2) sobre cada electrodo de titanio.

6.2. Potencial de celda

Para la caracterización electroquímica del reactor, se realizó una polarización de los electrodos para determinar el voltaje de celda al cual se transfiere carga entre los dos electrodos; para ello se utilizó un potenciostato-galvanostato PAR-173 de EG&G, al cual se le adaptó un voltímetro en línea para la obtención de las lecturas del potencial de celda. Se utilizaron dos electrodos de titanio (área de 35cm^2) recubiertos con óxido de rutenio a los extremos del reactor (previamente analizados), las

soluciones electrolíticas utilizadas fueron: para el ánodo NaOH (0.1 y 0.2 M) y para el cátodo H₂SO₄ (0.1 M), contenidos en los extremos del reactor. Se impusieron diferentes densidades de corriente en el reactor electroquímico y se midieron las lecturas del potencial de celda correspondiente en periodos de 10 minutos (aproximadamente), para cada una de las densidades de corriente aplicadas. Con los datos obtenidos se realizó un gráfico estándar del potencial de celda (V) en función de la densidad de corriente aplicada (mA/cm²). De esta gráfica, se seleccionaron tanto los intervalos de densidades de corriente, como de los potenciales eléctricos utilizados durante la segunda etapa del diseño experimental.

6.3. Microorganismo

Se utilizó una cepa de hongo filamentoso (*Aspergillus niger* C28B25). Esta cepa forma parte de la colección perteneciente al Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.

6.4. Condiciones de cultivo

6.4.1. Medio de conservación y propagación

Para la conservación de la cepa durante períodos de tiempo de hasta 6 meses y para la propagación del inóculo se utilizó el medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA-Bioxon), el cual se preparó de la siguiente manera: 39 g de medio PDA-Bioxon en 1.0 L de agua destilada, se calentó a baño maría hasta su total disolución. El medio preparado se colocó en tubos de ensaye y en matraces Erlenmeyer de 125 mL, los cuales se esterilizaron a 121 °C, durante 15 minutos, transcurrido ese tiempo se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que el medio estuviese totalmente solidificado.

6.4.2. Propagación de la cepa

Para la propagación de la cepa, se partió de la cepa conservada en medio PDA a 4 °C. La cepa se inoculó inicialmente en 2 tubos de ensaye inclinados con 8 mL de medio PDA, y se incubaron durante 7 días (tiempo que tarda el microorganismo en esporular completamente) a 30 °C, en un cuarto con temperatura controlada. Después de ese tiempo, uno de los tubos fue utilizado para la conservación de la cepa, reinoculando por estría cada 7 días. El segundo tubo fue utilizado para inocular 30 mL del medio PDA contenido en matraces Erlenmeyer de 125 mL, para ello, se suspendieron las esporas utilizando 2 mL de una solución estéril de Tween 80 al 0.1 %. A partir de estos últimos se cosechan las esporas para los estudios de fermentación en medio sólido.

6.5. Fermentación en medio sólido (FMS)

6.5.1. Soporte y tratamiento

En todos los ensayos realizados se utilizó agrolita como soporte inerte. La agrolita es una piedra de origen volcánico compuesta principalmente de sílice, de estructura amorfa y porosa, con una buena retención de agua en su superficie y químicamente inerte, por lo que es un buen soporte en el proceso de fermentación. Previo a su utilización, la agrolita fue tamizada (12/16) para obtener un tamaño de partícula de 1.19-1.68 mm, y fue lavada 4 veces, dos con agua corriente (caliente) y dos con agua desionizada; se dejó secar en una estufa a 65-70 °C durante 24 h. Posteriormente, se almacenó en desecadores, para evitar su hidratación.

6.5.2. Medio de cultivo para la FMS

El medio de cultivo utilizado fue el medio Pontecorvo concentrado (ATCC medio 687) con sacarosa como única fuente de carbono (Tabla 1), ya que es un medio que contiene todos los requerimientos nutricionales para el crecimiento de *A. niger*.

La preparación de este medio se realizó de la siguiente manera: en un matraz aforado de 100 mL previamente tarado se colocaron 50 mL de agua destilada y se le adicionó primero la fuente de carbono (sacarosa), posteriormente se le adicionaron las sales (una por una), y por último el extracto de levadura; esta preparación se realizó en una parrilla magnética con agitación constante. Finalmente, la solución se aforó a 100 mL con agua destilada, logrando así establecer las concentraciones indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo Pontecorvo (ATCC medio 687) concentrado con sacarosa como única fuente de carbono

Compuesto	Concentración (g/L)
Sacarosa	200.00
NaNO ₃	20.00
KH ₂ PO ₄	5.07
KCl	1.73
MgSO ₄ • 7H ₂ O	1.73
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.0033
FeCl ₃ • 6H ₂ O	0.0028
Extracto de levadura	1.67
Elementos traza (mL)	0.1
Agua destilada (cbp (L))	1.00

La solución de elementos traza u oligoelementos se preparó de la siguiente manera: En un vaso de precipitados de 100 mL se colocaron 85 mL de agua destilada, se disolvieron los metales traza (uno por uno), se ajustó el pH a 3.5 (hasta la disolución

de todos los minerales) con HCl al 10 %. Finalmente, la solución se aforó a 100 mL con agua destilada (Tabla 2). Una vez preparado el medio de cultivo se le adicionaron 100 μ L de solución de elementos traza (Tabla 1) y se almacenó en refrigeración a 4 °C.

Tabla 2. Composición de la disolución de elementos traza

Compuesto	Concentración (g/L)
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0.33
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.17
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.17
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.83
Agua destilada (cbp (L))	1.00
pH	3.5

6.5.3. Inóculo

Para la obtención del inóculo se hizo una cosecha de esporas (de los matraces Erlenmeyer previamente inoculados) con 30 mL de solución Tween 80 al 0.01 %, este procedimiento se realizó en una parrilla con agitación magnética durante 5 minutos aproximadamente, hasta la cosecha total de esporas.

A la suspensión de esporas obtenida se le hizo una dilución 1:20. De esta dilución se colocaron 140 μ L (aproximadamente), en los canales de la cámara de Neubauer, y se procedió a contar en el objetivo 40X del microscopio óptico (marca OLYMPUS BX 40). El conteo se realizó eligiendo 10 cuadros al azar. El número de esporas por cuadro debió estar entre 20-40, si resultó mayor, se realizó la dilución requerida, hasta alcanzar estos valores.

Para estimar la concentración de esporas, se realizó la siguiente fórmula:

No. de esporas por cuadro (promedio) x No. de cuadros (25) x Dilución (1:20) x 10000 (Factor de la cámara de Neubauer).

La concentración de esporas que se utilizó para cada ensayo experimental fue de 2.0×10^8 esporas por gramo de agrolita seca (gss).

6.5.4. Condiciones de fermentación

Para la preparación del medio de cultivo inoculado y absorbido en la agrolita seca, se preparó el medio Pontecorvo concentrado (Tabla 1). Se adicionó la cantidad de medio necesaria para tener 200 mg sacarosa por gramo de agrolita seca. Posteriormente, se adicionó el volumen de suspensión de esporas necesario para tener 2×10^8 esporas/g de agrolita seca (gss). Finalmente, se adicionó la cantidad de agua requerida para tener un contenido de agua equivalente a 3, 2.5 y 2 veces la humedad crítica de la agrolita (0.413 g de H₂O por gramo de agrolita seca). En todos los ensayos de fermentación en medio sólido, se utilizaron 40 g de agrolita seca.

6.5.5. Fermentación en reactores en columna

Para la determinación del tiempo de máxima producción de invertasa, se realizaron fermentaciones en reactores en columnas, para ello, se mezclaron 70 g de agrolita seca con el medio de cultivo previamente inoculado, la cantidad de agua para alcanzar la humedad deseada (p/v) y una concentración de sacarosa de 200 mg/gss. De la mezcla resultante, se empacaron 10 g aproximadamente en cada columna, dejándose el resto de la mezcla para la determinación de pH, conductividad eléctrica, actividad de agua (a_w), azúcares reductores, y sacarosa residual. Se utilizaron 6 columnas de vidrio de 2 cm de diámetro interno y 20 cm de longitud. Las columnas se colocaron en un cuarto de temperatura controlada a 30 °C, con un flujo de aire de 100 mL/min por columna. Se tomaron muestras por triplicado a diferentes tiempos: 30, 34 y 38 h de cultivo para cuantificar la actividad enzimática midiendo la liberación de azúcares reductores por la técnica de Miller modificada (Miller, 1960).

6.5.6. Fermentaciones en el reactor electroquímico

Para la evaluación del efecto del potencial eléctrico sobre el metabolismo de *A. niger*, se realizaron fermentaciones en medio sólido, las cuales se llevaron a cabo en reactores de acrílico de estructura rectangular con las siguientes dimensiones; 21 cm de longitud, 10 cm de ancho y 15 cm de altura. Estos reactores electroquímicos están acondicionados con un sistema de aireación y un sistema de salida para la obtención de valores de CO₂ en línea. Así como también cuentan con un dispositivo para generar un gradiente de potencial eléctrico en el lecho de fermentación (electrodos con un área de 35 cm²) (Fig. 3).

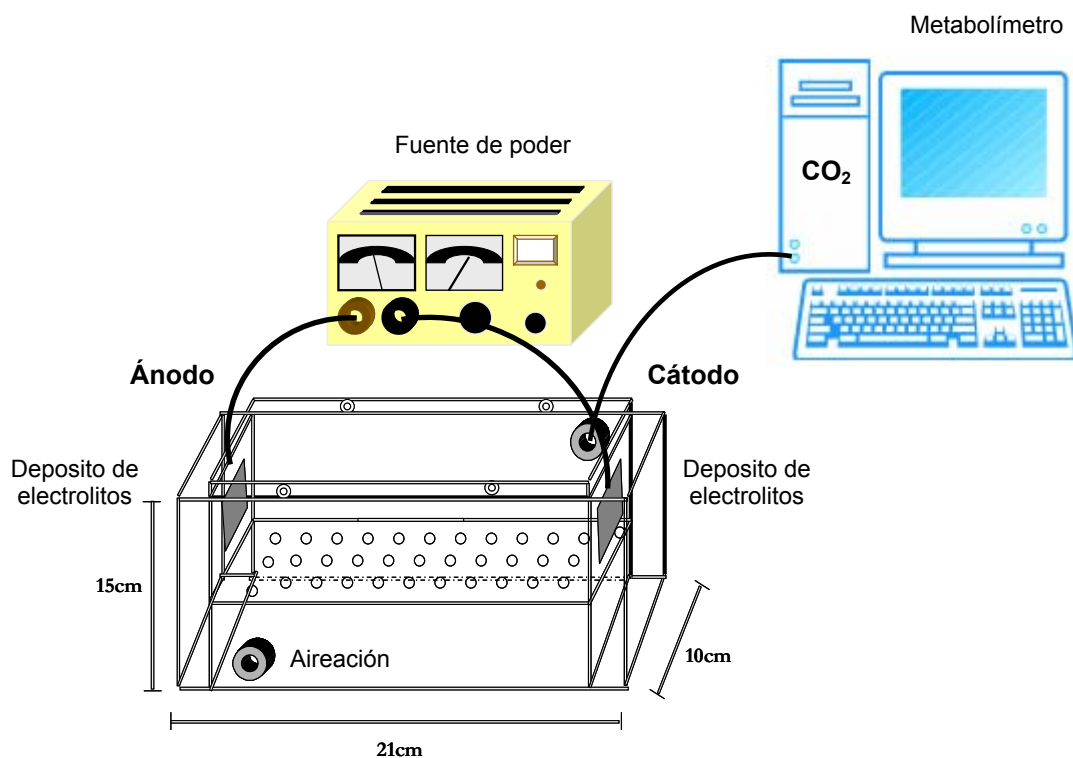


Figura 3. Esquema del sistema experimental

Los cultivos tuvieron una duración de 35 h. Se capturaron los valores de producción CO₂ con un metabolímetro con detector de infrarrojo cada 10 minutos, la exposición

al potencial eléctrico fue continua, es decir, durante las 35 h de cultivo. El reactor electroquímico se colocó en un cuarto de temperatura controlada a 30 °C, con un flujo de aire de 100 mL/min. Al finalizar el cultivo, se cuantificó la actividad enzimática midiendo la liberación de azúcares reductores por la técnica de Miller modificada (Miller, 1960), así como las variables fisicoquímicas involucradas en el crecimiento de *A. niger*.

6.6 Aplicación del potencial eléctrico

Para imponer un potencial eléctrico a voltaje-corriente variable, se utilizó un potencióstato-galvanostato PAR-173 de EG&G. En estos ensayos experimentales, se impusieron dos intensidades de corriente iniciales, durante las 35 h de cultivo, y se usó un voltímetro en línea para la obtención de los valores de potencial correspondientes a cada una de las corrientes impuestas. De manera inicial, en cada caso, se impuso una corriente eléctrica de 8.6 y 14.3 mA/cm² para obtener un valor de 10.5 V y 15.5 V, respectivamente. A intervalos de tiempo, la intensidad de corriente fue modificada para mantener el potencial eléctrico. Estos ensayos experimentales se realizaron por triplicado.

Para imponer un potencial eléctrico a voltaje constante, durante las 35 h de cultivo, se utilizó una fuente de poder marca MEIKO, modelo 1090, con intervalos de 0-25 V, y 0-15 A. En estos ensayos experimentales, se impusieron potenciales de 2.5, 5.5 y 10.5 V. En estos casos, se utilizó un amperímetro en línea para la obtención de los valores de corriente correspondientes a cada uno de los potenciales impuestos (0.8, 2.4 y 8.6 mA/cm², respectivamente). Estos ensayos experimentales se realizaron únicamente una vez.

En todos los ensayos experimentales, se utilizaron dos electrodos de placa (ánodo y cátodo) de titanio recubiertos con óxido de rutenio, con área de 35 cm², que además

de ser un material inerte a las reacciones químicas, permitió la migración de los iones contenidos en el sistema a través del lecho de fermentación.

6.7 Métodos analíticos

6.7.1 Análisis de CO₂ y determinación de los parámetros cinéticos

Se utilizó la producción de CO₂ como indicador del crecimiento de *A. niger*. Por lo tanto, la concentración de dióxido de carbono en el aire de salida del reactor electroquímico fue medida periódicamente con un metabolímetro marca FUJI ELECTRIC CO₂ CONTROLLER, que cuenta con un detector de infrarrojo, previamente calibrado con nitrógeno puro (N₂) y con una mezcla de gases CO₂ (5%) y O₂ (15%). Al finalizar el cultivo sin quitar el campo eléctrico, se tomaron datos de temperatura en el lecho de fermentación en 3 fracciones (0 a 7 cm, 7 a 14 cm y 14 a 21 cm; distancia ánodo-cátodo) del reactor electroquímico.

La determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento se hizo de manera indirecta como en trabajos anteriores (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994). Primero, la concentración fue expresada en mg de CO₂ por gramo de soporte seco inicial (gss). La velocidad de producción fue calculada como la diferencia en la concentración de CO₂ de dos mediciones consecutivas sobre el tiempo transcurrido entre ambas.

La cantidad total de CO₂ producido durante la fermentación se obtuvo del cálculo del área bajo la curva obtenida en la gráfica de la velocidad de producción contra el tiempo. Por otra parte, el tiempo de germinación (*Tlag*) se calculó usando la gráfica de la producción acumulada de CO₂ contra el tiempo; la intersección con el eje X de la recta obtenida entre la fase de crecimiento exponencial y la fase de desaceleración se tomó como el tiempo de germinación. La velocidad específica de crecimiento se determinó como la pendiente de la línea recta obtenida en la gráfica del logaritmo del CO₂ producido contra el tiempo.

Tratamiento y análisis de las muestras:

Para el análisis de las muestras, inicialmente el lecho de fermentación en el reactor electroquímico fue fraccionado en tres partes iguales a distancias establecidas (0-7, 7-14 y 14-21 cm). A cada una de las fracciones se les realizó una extracción de acuerdo con el siguiente procedimiento: A 5 g de materia húmeda fermentada se adicionaron 50 mL de agua desionizada, se agitaron perfectamente durante 5 minutos y se filtraron mediante una bomba de vacío, usando papel filtro Whatman No. 42. De los extractos resultantes se realizaron las determinaciones descritas a continuación.

6.7.2 Actividad enzimática

La actividad de invertasa se determinó cuantificando la cantidad de azúcares reductores liberados, a partir del método descrito por Miller (1960). Inicialmente, se realizó una curva estándar. La solución estándar se preparó adicionando 250 mg de glucosa y 250 mg de fructosa en 500 mL de buffer de acetatos 0.1 M a pH 5. Posteriormente, se etiquetaron tubos del 1 al 7 y a cada uno de ellos se les agregó 1 mL de buffer de acetatos 0.1 M a pH 5, posteriormente al tubo 1, se le agregó 1 mL de la solución estándar y se agitó en vortex, de ese tubo se tomó 1 mL y se adicionó al tubo 2 y así sucesivamente hasta llegar al tubo 5, al cual, después de la agitación se le extrajo 1 mL. Los tubos 6 y 7 que contenían únicamente buffer de acetatos 0.1 M a pH 5, se utilizaron como blancos. Finalmente, a todos los tubos se les agregó 1.5 mL de reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico).

Para cuantificar la actividad enzimática del extracto, se utilizaron tubos previamente etiquetados como A y B, los tubos A, se utilizaron para la reacción enzimática y los tubos B, se utilizaron como testigos (ambos por duplicado). Inicialmente, se preparó el sustrato que consistió en una solución de sacarosa 0.1 M en buffer de acetatos 0.1 M a pH 5. En ambos tubos (A y B) se agregaron 0.9 mL de solución de sacarosa

0.1M y se incubaron en un baño a temperatura controlada a 50 °C. A los tubos B, se les adicionaron 1.5 mL de reactivo de DNS. Posteriormente, en ambos tubos se agregó 0.1 mL de extracto enzimático a cada tubo, agitando en cada adición; después de 10 minutos de incubación, a los tubos A, se le adicionaron 1.5 mL de reactivo DNS, en intervalos de 1 minuto. Todos los tubos, tanto los de la curva estándar como los del ensayo enzimático se colocaron en un baño de agua a ebullición durante 15 minutos, una vez transcurrido el tiempo se dejaron enfriar en agua corriente. Finalmente, se determinó el valor de absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda 25 a una longitud de onda de 640 nm. Una unidad de actividad enzimática (UI) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de azúcares reductores por minuto.

6.7.3 Consumo del sustrato

Para el análisis del consumo de sacarosa al final de la fermentación, se realizaron protocolos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando el equipo HPLC Perkin Elmer LC, con un detector I.R. LC-30, una columna Phenomex para ácidos orgánicos, con una longitud de 300 mm, un diámetro interno de 7.8 mm, y un tamaño de partícula de 8 μm . La temperatura de operación fue de 35 °C usando un controlador de temperatura Eppendorf TC-50 y un calentador de columna CH-30, presión de 480-500 psi. Para la adquisición de datos se empleó el programa PE Nelson (Mod. 1020 Bios Versión 2.00). Como fase móvil, se utilizó una solución acuosa de H_2SO_4 0.005 N filtrada y desgasificada con un flujo de 0.5 mL/min. El volumen de inyección fue de 20 μL . Se utilizaron soluciones estándar de glucosa, fructosa y sacarosa a una concentración de 1 g/L.

6.8 Variables fisicoquímicas

6.8.1. Determinación de pH y conductividad eléctrica

El pH y la conductividad eléctrica se determinaron al inicio y al final de la fermentación, para ello, se suspendieron 5 g de materia no fermentada y/o fermentada en 50 mL de agua destilada, se homogeneizó en una parrilla de agitación y se filtró al vacío con papel filtro Whatman 42, al filtrado, se le determinó el pH con un potenciómetro marca CONDUCTRONIC pH 120. La conductividad eléctrica, se determinó con un conductímetro marca CONDUCTRONIC CL 30.

6.8.2 Determinación de humedad y actividad de agua

El contenido de humedad fue analizado al inicio y al final de la fermentación, y se determinó colocando 2 g de materia fermentada en un analizador de humedad o termobalanza OHAUS MB45 a 130 °C por 15 minutos. La actividad de agua (a_w) inicial y final se determinó colocando una pequeña fracción de la materia fermentada (aproximadamente 3 g) en una celda de higrómetro marca AQUA LAB CX-2.

6.9 Análisis estadístico

Cabe señalar que los ensayos tanto experimentales como analíticos en condiciones de voltaje-corriente variable, fueron realizados por triplicado. Por otro lado, los ensayos en condiciones de voltaje constante, son ensayos únicos, sin embargo, sus ensayos analíticos, se realizaron por triplicado.

Los datos obtenidos fueron analizados por medio del programa EXCEL para Windows XP. Se realizaron pruebas estadísticas, como análisis de varianza para la comparación de ensayos, por medio del programa estadístico NCSS. Las comparaciones se realizaron entre los diferentes potenciales eléctricos aplicados

para cada una de las distancias o fracciones analizadas en el reactor electroquímico (0-7, 7-14 y 14-21 cm).

CAPÍTULO 7

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta sección se divide en tres partes; en la primera parte, se presenta la caracterización y estandarización del proceso de fermentación en medio sólido (FMS). En la segunda parte, se presenta la caracterización voltamperométrica de los electrodos, así como el análisis electroquímico del soporte de fermentación (agrolita) en el reactor electroquímico (etapa abiótica). Con base en los resultados obtenidos en estas dos primeras fases experimentales, se definieron las condiciones de ensayo para la realización de la tercera y última parte, en la que se presentan los resultados del estudio del metabolismo de la sacarosa y producción de invertasa, así como, la evaluación de los parámetros de crecimiento de *A. niger* en ausencia y presencia de un potencial eléctrico (etapa biótica).

7.1. Caracterización y estandarización del proceso de FMS

Una de las variables importantes en el marco de este trabajo, es la producción de invertasa, para ello, se realizaron ensayos de fermentación en medio sólido (FMS), utilizando agrolita como soporte inerte. Las fermentaciones se llevaron a cabo en reactores tubulares de vidrio, se realizó un muestreo a tres tiempos de fermentación (30, 34, y 38 horas; cada tiempo fue evaluado por triplicado), para evaluar la actividad enzimática y de esta manera determinar el tiempo de máxima producción de invertasa.

En la figura 4 se muestra la producción de invertasa en función de los tiempos evaluados. Se observa que la producción de invertasa tiende a aumentar al paso del tiempo de cultivo hasta alcanzar un valor mayor a las 34 horas con una actividad enzimática de 40 UI/gss., después de este tiempo se observa una ligera disminución de la actividad enzimática. Esta disminución puede estar asociada a la presencia de proteasas y a cambios del pH en el medio; debido principalmente a la producción de metabolitos por *A. niger* durante su crecimiento (Boddy *et al.*, 1993).

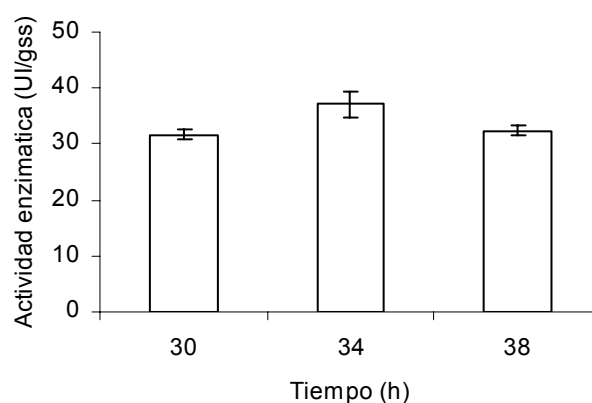


Figura 4. Producción de invertasa por *A. niger* en reactores tubulares con sacarosa como única fuente de carbono (200 mg/gss) a 30 °C, (ensayo realizado por triplicado).

Diversos trabajos realizados sobre la producción de invertasa, utilizan como modelo de estudio, principalmente a las levaduras (Workman and Day, 1983, Belcarz *et al.*, 2002), debido a que estos microorganismos son la fuente principal de invertasa en una escala comercial (Vargas *et al.*, 2004). Se han realizado estudios, en donde se ha encontrado que la producción de invertasa se obtiene a tiempos cortos, por mencionar algunos de ellos, están el trabajo realizado por Costaglioli *et al.*, (1997), en el que utiliza *Schawanniomyces occidentalis* en un medio de cultivo suplementado con glucosa y rafinosa, en el cual, obtienen la mayor actividad de invertasa a las 15 h de cultivo. Por otro lado, utilizando *Phaffia rhodozyma* en un medio de cultivo con sacarosa como inductor de la producción de invertasa, la mayor actividad se obtiene entre las 24 y 26 h de cultivo (Persike *et al.*, 2002).

Los hongos filamentosos son otro modelo de estudio para la producción de invertasa; sin embargo, los tiempos de cultivo generalmente son mayores que los definidos para levaduras. Por ejemplo, en cepas de *Aspergillus fumigatus*, se informó la mayor actividad intracelular y extracelular después de 96 h de cultivo (Fiedurek *et al.*, 2000). Por otro lado, Mukherjee *et al.*, (2002) informaron la producción de invertasa por *Termomitomyces clypeatus* cuando el hongo fue cultivado por 5 días en un medio sintético con 1.0 % de sacarosa. Santana and Costa, (2005) reportaron la producción de invertasa por el hongo *Cladosporium cladosporioides* cultivado en medio semisintético después de 20 días de cultivo.

En los casos anteriores, la mayor producción de invertasa se logró en tiempos hasta 10 veces mayores a los reportados en este trabajo para el hongo filamentosos *A. niger* C28B25, esto puede ser debido al tipo y tamaño de partícula del soporte utilizado, ya que esta es una condición de cultivo importante en la FMS que presenta ciertas ventajas y desventajas de su uso en la producción de enzimas (Ooijkaas *et al.*, 2000). Esta respuesta está asociada también a la concentración del sustrato, a las condiciones de humedad y actividad de agua en el medio, ya que el crecimiento óptimo y la producción de enzimas por *A. niger*, depende en gran medida de los valores óptimos de dichas condiciones (Raimbault, 1998).

Dado el perfil de la actividad enzimática obtenido a los tiempos evaluados, se definió en la primera etapa experimental, el tiempo de cultivo aproximado (35 h) para los estudios realizados en presencia y ausencia de un potencial eléctrico en el reactor. Cabe señalar que la invertasa es una proteína inducible que está asociada al crecimiento de *A. niger* (Gracida *et al.*, 2004), por lo que como se observará más adelante, la producción de CO₂, también permitió definir el tiempo de máxima producción de esta enzima.

7.1.1. Efecto del contenido de humedad inicial sobre el crecimiento y la producción de invertasa de *A. niger*

Aunque requieren humedad para su desarrollo, los hongos filamentosos pueden sobrevivir en ambientes con bajo contenido de humedad. Uno de los factores más importantes en los procesos de fermentación en medio sólido (FMS) es la baja disponibilidad de agua en el sistema (Mitchell *et al.*, 2000). Debido a que el agua es un compuesto esencial en el metabolismo de los microorganismos en estos procesos, si ésta se encuentra en cantidades insuficientes, no habrá una buena difusión de solutos y gases, el metabolismo celular podría retardarse o se puede, incluso detener, debido a una falta de sustratos o a una inhibición, por la concentración tan alta de metabolitos, en o cerca de la célula (Gervais *et al.*, 1988).

Otras de las implicaciones de la insuficiencia de la cantidad de agua en los procesos de FMS, son: si la cantidad de agua intracelular o extracelular no permite el mantenimiento de las propiedades funcionales de algunas enzimas, su inactividad crea un desequilibrio en las rutas metabólicas de las células. De la misma manera, si el transporte de agua induce al estrés hídrico, permitiendo la desnaturalización de la estructura mecánica de la membrana plasmática, todas las propiedades de permeabilidad y transporte a través de la membrana celular serían afectadas (Gervais *et al.*, 1996). En estudios de FMS previos, se ha demostrado que los valores óptimos de humedad para la producción de un metabolismo deseado, o para su crecimiento, son fuertemente dependientes del microorganismo y del soporte utilizado.

Dada la importancia del contenido de humedad, tanto en la producción de enzimas, metabolitos y crecimiento de *A. niger*, así como en los procesos electroquímicos en este sistema, en el presente trabajo se evaluaron diferentes contenidos de humedad inicial en el soporte utilizado (agrolita); 1.83, 1.50, y 1.22 gH₂O/gss., valores

correspondientes a 3, 2.5 y 2 veces la humedad crítica del soporte (0.61 gH₂O/gss), o bien, a un porcentaje de humedad de 60, 55, y 45 %, respectivamente.

7.1.1.1 Producción de CO₂

El crecimiento es un componente esencial de la función microbiana, y puede medirse directamente como el incremento de la masa celular, o indirectamente con la producción de CO₂. La velocidad de crecimiento es el cambio en el número de células o en la masa celular experimentado por unidad de tiempo. El modelo más adecuado para definir el crecimiento celular es el crecimiento exponencial, este modelo define el incremento de la población, en el que en cada período fijo de tiempo se duplica el número de células.

Una característica del crecimiento exponencial es que la velocidad del aumento en el número de células es inicialmente lenta, pero se incrementa cada vez más con el tiempo hasta alcanzar un valor máximo. Para fines de este trabajo, en el que se realizaron los ensayos por duplicado, la representación de la velocidad de producción de CO₂ es presentada en barras, ya que en ellas se pueden observar las desviaciones estándar correspondientes. El valor graficado por tanto, es la velocidad máxima de producción de CO₂ obtenido en cada uno de los contenidos de humedad inicial evaluados.

En la figura 5 se presenta la velocidad máxima de producción de CO₂ por *A. niger* en función del contenido de humedad inicial del soporte. En esta figura se observa que la velocidad máxima de producción de CO₂ fue de 6.0 mgCO₂/gss h, y fue similar a los valores obtenidos en los diferentes contenidos de humedad evaluados. Los tiempos de cultivo a los que se obtuvieron dichos valores fueron 18, 21 y 29 h en los medios con un contenido de humedad de 60, 55 y 45%, respectivamente, este comportamiento está asociado a la disminución de la fase *lag* en un 50%, en los medios con mayor contenido de humedad inicial, y por tanto a la estimulación de la

tasa específica de crecimiento; alcanzando así en menor tiempo, la velocidad máxima de producción de CO₂. Lo anterior se puede deber a una mayor velocidad de hidratación de las esporas de *A. niger* en el medio con mayor contenido de humedad (60%), y consecuentemente a una mayor velocidad de crecimiento. Este resultado, es similar al reportado por Nuñez (2004), en el que demuestran que la duración de la fase *lag* disminuye conforme se incrementa el contenido de humedad inicial del soporte (PUF), en las diferentes concentraciones de sacarosa estudiadas.

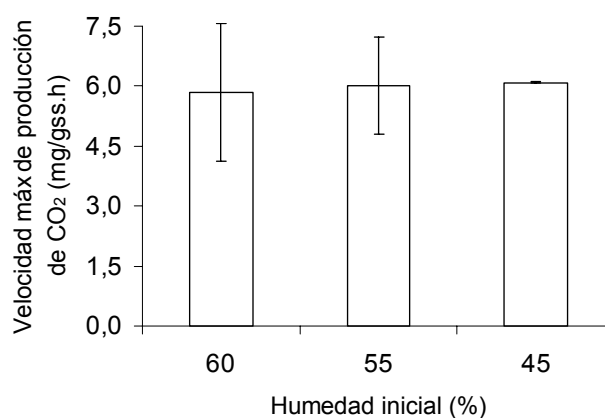


Figura 5. Velocidad máxima de producción de CO₂ por *A. niger* a 35 h de cultivo con diferentes contenidos de humedad inicial del soporte (ensayos realizados por triplicado).

Por otro lado, en la figura 6 se presenta la producción total de CO₂, es decir; la cantidad de CO₂ acumulada durante las 35 h de cultivo, en función del contenido de humedad inicial del soporte; 60, 55, y 45 %. De los ensayos realizados con los diferentes contenidos de humedad, se observa que la mayor cantidad de CO₂ acumulado fue de 70 mgCO₂/gss, y se obtuvo con un contenido de humedad del 55%. Sin embargo, se observa que cuando el porcentaje de humedad inicial es bajo, o cuando éste se encuentra en exceso, el CO₂ acumulado, tiende a disminuir ligeramente hasta valores de 60 mgCO₂/gss.

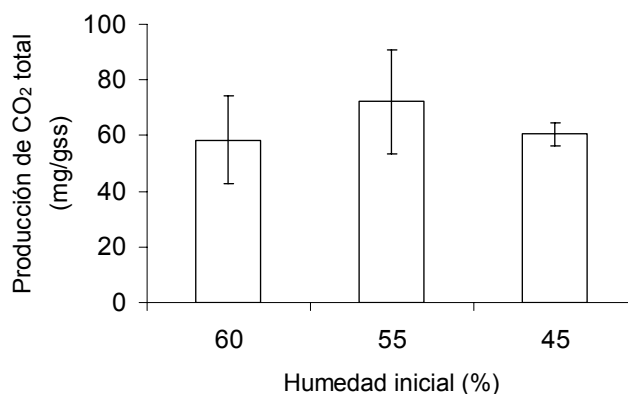


Figura 6. Producción de CO₂ total por *A. niger* a 35 h de cultivo con diferentes contenidos de humedad inicial del soporte (ensayos realizados por triplicado).

En un estudio previo (Gervais *et al.*, 1988), se reporta que si el contenido de humedad en el soporte es insuficiente, no existe una buena difusión de solutos y gases, por lo tanto, el crecimiento, reproducción y metabolismo celular se retardan o se pueden incluso detener debido a una falta de sustratos o a una inhibición por la concentración tan alta de metabolitos, en o cerca de la célula. Por el contrario, de acuerdo a lo descrito por Raimbault, (1998) menciona que si la cantidad de agua en el sistema se encuentra en exceso, se provoca escurrimiento del lecho de fermentación en el sistema (como sucede en este caso a un 60% de humedad), ya que se excede el nivel de la capacidad de retención de agua del soporte, provocando el lavado de nutrientes, del mismo modo existe la posibilidad de que éstos, en un exceso de agua se encuentren diluidos, disminuyendo la disponibilidad de nutrientes a la célula, y con ello el metabolismo microbiano.

Con los resultados obtenidos en esta parte experimental, se comprueba que el agua presente en este tipo de sistemas, como lo es la fermentación en medio sólido, es un elemento esencial, tanto en el crecimiento como en el metabolismo microbiano, ya que de ello depende la disponibilidad de los nutrientes o sustratos, así como también de la humedad necesaria para el desarrollo de la hifas y micelio, morfología característica de este tipo de microorganismos, como *A. niger*. Además de que ello,

permitió definir el contenido de humedad inicial del soporte a utilizar durante los ensayos de la segunda etapa (biótica), que para este estudio fue del 55% de humedad inicial. Dados los resultados anteriores y para fines de este estudio, se decidió elegir como contenido de humedad óptimo 55 %, a las condiciones experimentales evaluadas.

7.1.1.2. Producción de invertasa

Una de las principales ventajas que tiene la fermentación en medio sólido, es el empleo de altas concentraciones de fuente de carbono, sin que esto afecte negativamente el crecimiento y en algunos casos la producción de enzimas, minimizando así la represión catabólica (Solís-Pereira *et al.*, 1996). En la figura 7 se presentan los resultados de la producción de invertasa en función del contenido de humedad inicial del medio de cultivo y de la distancia del reactor (0-7, 7-14, 14-21 cm), después de 35 h de cultivo; así como las desviaciones estándar correspondientes.

De los contenidos de humedad analizados, se observó que la mayor actividad enzimática obtenida fue alrededor de las 15 UI/gss, y se obtuvo con el mayor contenido de humedad inicial (60 %), mostrando, a pesar de las desviaciones estándar, diferencias significativas (Anexo 1) con respecto a los contenidos de humedad menor (55 y 45 %), en los que la actividad enzimática fue de alrededor de las 10 UI/gss para ambos casos y en todo el lecho de fermentación (7-21 cm). Sin embargo, este contenido de humedad (60 %) en el sistema provocó escurrimiento, con ello, como ya se mencionó anteriormente el lavado de nutrientes, por lo que este valor se descartó de la selección de contenido de humedad para los ensayos con potencial eléctrico.

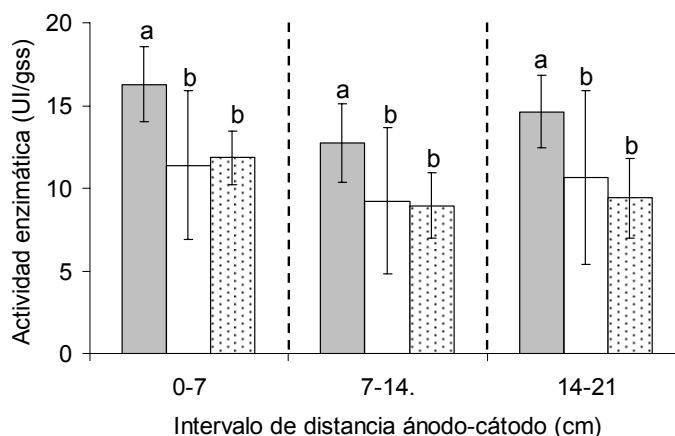


Figura 7. Producción de invertasa por *A. niger* a 35 h de cultivo con sacarosa como única fuente de carbono (200 mg/gss), con diferentes contenidos de humedad inicial □ 60 %, □ 55 %, ▨ 45 % a 35 h de cultivo. Los valores con diferente notación (a, b, c) en cada fracción, presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) (ensayos realizados por triplicado).

En estudios previos usando reactores en columnas, realizados bajo las mismas condiciones de experimentación que aquí se plantean, se encontró una actividad enzimática de tres a diez veces mayor a la reportada en este trabajo (hasta 50 UI/gss) (Gerardo-Mendoza, 2003). Por otro lado, en un estudio realizado por Nuñez (2004), utilizando como soporte inerte espuma de poliuretano (PUF), se reportó una máxima producción de invertasa de 147 UI/gss a una concentración inicial de sacarosa de 200 mg/gss y una humedad inicial de 61 %.

Las diferencias en los valores de actividad enzimática, pueden deberse al tipo de reactor utilizado, ya que en el presente estudio se utilizó un reactor rectangular, en el que hipotéticamente puede existir acumulación de calor metabólico, principalmente en la fracción media de este reactor (7-14 cm) que afectaría indirectamente la síntesis enzimática y/o su actividad catalítica, contribuyendo a la obtención de valores bajos de producción de la invertasa.

Otras variables importantes en el metabolismo microbiano, y en la estandarización de los procesos de fermentación, son: el pH, la actividad de agua (a_w) y la humedad.

Para fines de este trabajo, también se realizaron determinaciones de la conductividad eléctrica en el sistema.

El pH es una de las variables importantes para el crecimiento microbiano, así como también ayuda a entender parte del metabolismo de *A. niger*, ya que éste durante su crecimiento secreta metabolitos que modifican el pH del medio de cultivo. La mayoría de los hongos filamentosos crecen favorablemente a valores bajos de pH. Esto suele ser una ventaja, ya que el control de pH es muy difícil en la fermentación en medio sólido (FMS). Sin embargo, se tienen desventajas cuando se trata de la producción de enzimas, ya que muchas de ellas, como la invertasa, suelen ser inestables a pH ácidos, por lo que en este tipo de procesos, es importante el control del mismo.

En la figura 8A se presentan los perfiles finales de pH en función de la distancia entre el ánodo y cátodo en el sistema, con diferentes contenidos de humedad inicial del medio de cultivo. Se observa que los valores de pH determinados en las fracciones del reactor estudiadas, a pesar de la cantidad de agua presente en el medio de cultivo, no presentan diferencias significativas (Anexo 2), obteniendo en todos los casos, valores cercanos a la neutralidad, es decir, de 7 unidades. Los valores de pH determinados antes de la fermentación (Tabla 3), fueron de alrededor de las 6 unidades, y se obtuvieron en los diferentes contenidos de humedad analizados. Este cambio en los valores de pH, es debido principalmente a la producción de metabolitos por *A. niger* durante el cultivo.

De acuerdo a lo descrito por Boddy *et al.*, (1993), los valores de pH obtenidos, no son favorables para la producción de invertasa ya que el define que el pH óptimo para la producción de invertasa es de 5.5 unidades. Sin embargo, en un estudio reciente realizado por Nuñez (2004), se reportó que la mayor estabilidad de invertasa se obtiene con pH cercano a la neutralidad, éste valor de pH es similar al observado en este trabajo, en el cual, los valores obtenidos oscilaron alrededor de las 7

unidades, con lo cual, se establece un pH óptimo para la producción de invertasa por *A. niger* a las condiciones de experimentación dadas.

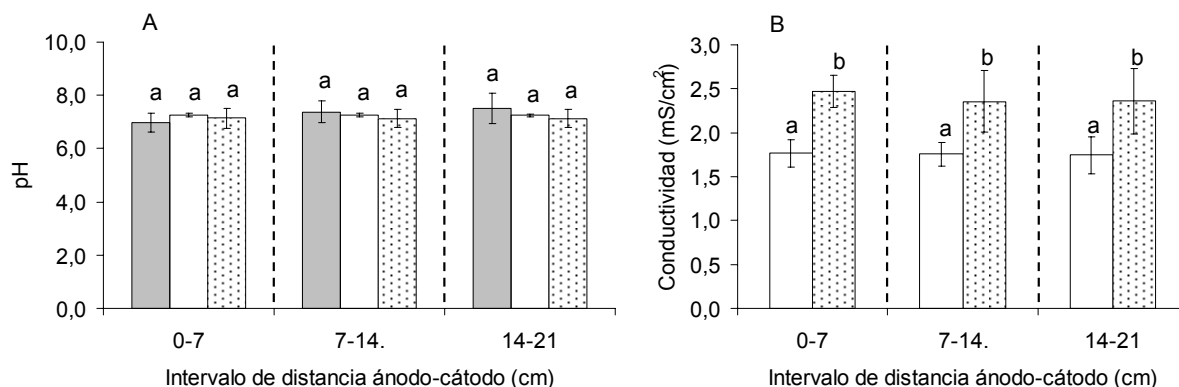


Figura 8. Valores de pH (A) y conductividad eléctrica (B) al final del cultivo (35 h) con diferentes contenidos de humedad inicial \square 60%, \square 55%, \square 45%. Los valores con diferente notación (a, b, c) en cada fracción, presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) (ensayos realizados por triplicado).

Tabla 3. Valores de pH y conductividad eléctrica al inicio de la fermentación

Humedad crítica	pH	DS	Conductividad (mS/cm ²)	DS
3.0 (60%)	5.8	0.5	*	*
2.5 (55%)	5.4	0.0	1.9	0.1
2.0 (45%)	6.0	0.1	2.7	0.0

* Dato no determinado; DS desviación estándar

En la figura 8B se presentan los valores de conductividad al término de la fermentación en función de la distancia en el reactor. Se observa que la mayor conductividad, es decir, la cantidad de iones disueltos en el lecho de fermentación fue de 2.5 mS/cm², y se obtuvo con el menor contenido de humedad (45 %), observando diferencias significativas con respecto al contenido de humedad del 55 % (Anexo 3), en el que se observó una conductividad de 1.7 mS/cm². Los valores de conductividad eléctrica al inicio del cultivo, fueron de 1.9 y 2.7 mS/cm², para los ensayos con humedades de 55 y 45 %, respectivamente (Tabla 3), estos valores son similares a los obtenidos después de 35 h tiempo de cultivo. En ambos contenidos de humedad, la disminución en la conductividad eléctrica fue el mismo (Δ 0.2 unidades), esto hipotéticamente pudiese estar relacionado con la utilización de los

nutrientes (iones) por *A. niger* para su crecimiento y metabolismo durante las 35 h de cultivo, con ello, observándose una disminución de los mismos, que se ve reflejada en una conductividad eléctrica menor a la inicial.

En ambos ensayos, los valores de conductividad son similares en las tres fracciones del reactor, lo que demuestra también la homogeneidad del sistema, ya que la cantidad de los componentes de fermentación, tanto nutrientes como de agua e inóculo, se encuentran presentes en todo el lecho de fermentación.

La conductividad eléctrica es una variable de importancia en el marco de este trabajo, ya que permitirá la observación de gradientes de iones a lo largo del reactor en los ensayos al aplicar campos eléctricos, ya que estos responderán a una corriente impuesta en el reactor, denotándose un gradiente de concentración de iones en todo el lecho de fermentación (0-7, 7-14, 14-21 cm).

Otros de los factores importantes en el crecimiento microbiano, son la actividad de agua (Pandey, 2003) y la cantidad de agua presente en los sistemas de fermentación (Mitchell *et al.* 2000). La actividad de agua (a_w) es un parámetro fundamental para la transferencia de agua y solutos en las células (Pandey, 2003). La cantidad de agua libre depende del contenido de humedad, de la composición del medio de cultivo y de la interacción del agua con el soporte sólido. En estudios de FMS previos, se ha demostrado que los valores óptimos de humedad para la producción de un metabolismo deseado, o para su crecimiento, son fuertemente dependientes del microorganismo y del tipo de soporte utilizados (Oriol *et al.*, 1988; Raimbault, 1998).

En la figura 9A se muestran los valores de actividad de agua al término del cultivo en función de la distancia ánodo-cátodo en el reactor, la actividad de agua encontrada en todos los ensayos fue de 0.999, en los que no se observan diferencias significativas, tanto para los diferentes contenidos de humedad como en las

diferentes fracciones evaluadas (Anexo 4). Los valores de a_w determinados antes de la fermentación fueron de 0.988 (Tabla 4), valores similares a los obtenidos al término del cultivo.

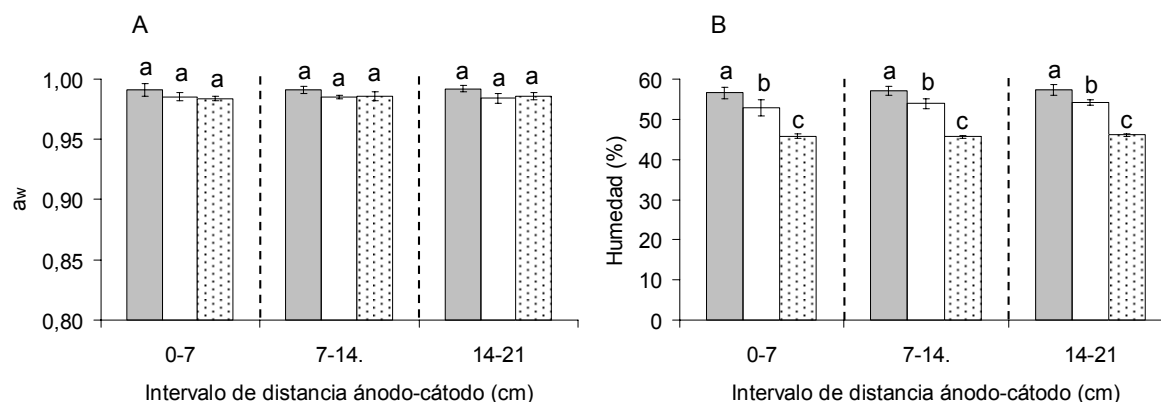


Figura 9. Valores de actividad de agua (a_w) (A) y contenido de humedad (B) al final del cultivo (35 h), con diferentes contenidos de humedad inicial \square 60%, \square 55%, \square 45% a 35 h de cultivo. Los valores con diferente notación (a, b, c) en cada fracción, presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) (ensayos realizados por triplicado).

Tabla 4. Valores de Actividad de agua (a_w) y contenido de humedad al inicio de la fermentación

Humedad crítica	a_w	DS	%Humedad	DS
3.0 (60%)	0.988	0.0	*	*
2.5 (55%)	0.978	0.0	53.3	1.22
2.0 (45%)	0.977	0.0	46.4	0.20

* Dato no determinado; DS desviación estándar

De acuerdo con lo descrito por Mitchell *et al.*, (2000), este valor de a_w , está dentro de los valores óptimos para el crecimiento de *A. niger*, ya que estos autores recomiendan valores de a_w superiores a 0.95 para sustratos sólidos. Con estos valores pueden crecer diferentes especies de hongos, especialmente hongos filamentosos como *A. niger* que crecen adecuadamente a una a_w de 0.96-0.98, comparados algunas bacterias y levaduras.

El contenido de humedad encontrado al término del cultivo (Fig. 9B), fue del 58, 55, y 45% en los ensayos con 3 (60 %), 2.5 (55 %) y 2 (45 %) veces la humedad crítica,

respectivamente. Al realizar el análisis estadístico, se observa que existen diferencias significativas entre los contenidos de humedad en cada fracción del reactor (Anexo 5). Los valores de humedad determinados antes de la fermentación se muestran en la tabla 4, dichos valores, son similares a los obtenidos al término del cultivo. Los valores de humedad obtenidos, se encuentran dentro del contenido de humedad idóneo para el crecimiento de *A. niger*, de acuerdo con lo descrito por Mitchell *et al.*, (2000).

El contenido de humedad será una variable importante en la segunda etapa, en la que se aplicaran campos eléctricos a los procesos de FMS, asegurando con ello, que es en este tipo de sistemas no exista deshidratación, y por lo tanto, el crecimiento de *A. niger* no se vea afectado por esta variable. Cabe señalar, que con un contenido del 60 % (3HC) de agua en el medio, el lecho de fermentación presentó escurrimiento, ya que es un nivel que sobrepasa la capacidad de retención de agua del soporte utilizado (agrolita), por lo que para fines de este estudio, se decidió realizar los siguientes ensayos con un contenido de humedad del 55 %.

7.1.1.3. Conclusiones parciales

De los ensayos realizados en reactores en columnas, la mayor producción de invertasa en fermentación en medio sólido se alcanzó a las 34 h, este resultado permitió definir el tiempo de cultivo (35 h) de los ensayos posteriores en ausencia y presencia de un potencial eléctrico.

La velocidad máxima de producción de CO₂ y la producción de CO₂ total, así como las variables fisicoquímicas involucradas en el crecimiento de *A. niger* no mostraron cambios considerables con respecto a los contenidos de humedad evaluados. La cepa de *A. niger* fue capaz de producir invertasa extracelular al someterla a un cultivo con sacarosa (200 mg/gss) como única fuente de carbono y con diferentes contenidos de humedad del soporte. De los ensayos analizados, la mayor producción

de invertasa se obtuvo con un 60 % de humedad, sin embargo, en estos ensayos se observó escurrimiento en el sistema, y dadas las condiciones para el estudio electroquímico, en el que la cantidad de agua es importante, se decidió utilizar como contenido de humedad para los ensayos posteriores un contenido de humedad del 55 %.

7.2. Estudio Electroquímico del Reactor

7.2.1. Caracterización voltamperométrica de los electrodos

La voltamperometría de barrido de potencial cíclica o voltamperometría cíclica, es una técnica de gran utilidad cuando se desea iniciar el estudio electroquímico (características de óxido-reducción) de un sistema desconocido. En este método, la respuesta de corriente (o densidad de corriente producida) del sistema a las perturbaciones de potencial, se representan en forma gráfica de manera tal que permite una rápida interpretación cualitativa sobre el potencial al cual las reacciones tienen posibilidad de ocurrir (Mabbott, 1983).

La figura 10 muestra el voltamperograma cíclico del barrido de óxido de rutenio soportado en titanio en ácido perclórico como electrolito soporte, con un intervalo de barrido de +0.8 V a -1.0 V/SSE. En esta figura, se presenta la densidad de corriente (mA/cm^2) en función del potencial de electrodo (mV/SSE), y se observa una respuesta en la corriente por parte del electrolito soporte tanto en el sentido anódico como en el sentido catódico, mostrando patrones clásicos de los procesos de oxidación y reducción de una voltamperometría cíclica (Mabbott, 1983).

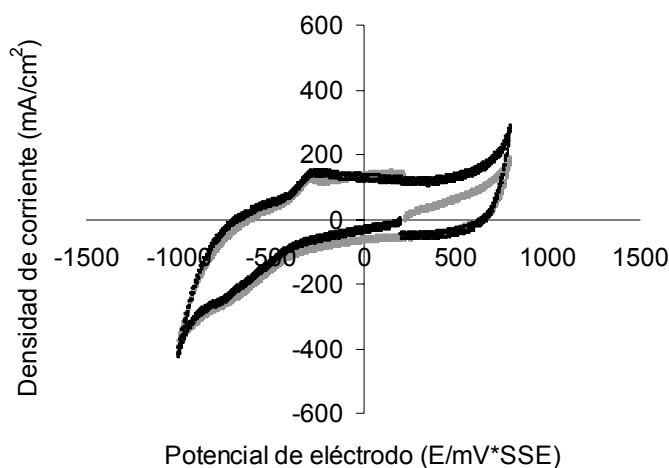


Figura 10. Voltamperograma cíclico para una disolución de ácido perclórico (0.2 M) utilizando un electrodo de titanio recubierto con óxido de rutenio, intervalo de potencial de +0.8 V a -1.0 V, ■ dirección de barrido de potencial negativo (catódico), ■ dirección de barrido de potencial positivo (anódico).

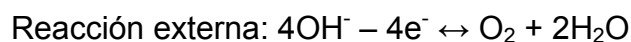
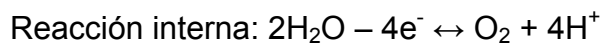
Dados los patrones de respuesta, se deduce que las reacciones existentes, se deben únicamente al efecto de las sustancias electroactivas presentes en el electrolito soporte y no a la oxidación del óxido de rutenio soportado en titanio (electrodos), mostrando de esta manera la actividad de los electrodos y con ello su adecuada elección para los ensayos en los procesos bióticos. Cabe mencionar que todos los electrodos evaluados mostraron el mismo patrón de respuesta, eligiéndose a cualquiera de ellos para dichos ensayos.

7.2.2. Potencial de celda (reactor electroquímico)

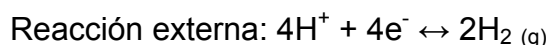
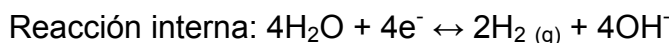
Todas las reacciones electroquímicas ocurren con transferencia de electrones; son por tanto, reacciones redox, que ocurren físicamente en ambientes separados. La entrada/salida de corriente (electrones) en un sistema electroquímico, se realiza con un dispositivo formado por celdas electroquímicas, donde ocurre la reacción, y por los electrodos, donde entra y sale la corriente eléctrica. En dichas celdas ocurren

reacciones electroquímicas debido a los cambios en el potencial o corriente eléctrica, este proceso se llama electrólisis, cuyas reacciones primarias son:

Para el ánodo:



Para el cátodo:



En el reactor, la carga es conducida por el movimiento de iones, esta fuerza mueve los electrones del ánodo al cátodo a través de un circuito externo. La transferencia de carga entre la agrolita impregnada con medio de cultivo y un determinado contenido de humedad, se hace a través de la reacción de oxidación del agua en el extremo anódico y la reducción de ésta en el extremo catódico del sistema (Fig.12). Para la obtención de estas reacciones, se utilizaron dos electrolitos soportes, a diferentes concentraciones, de 0.1 a 0.2 M NaOH (para el ánodo) y 0.1 M H₂SO₄ (para el cátodo).

El origen de esta fuerza es una diferencia de energía potencial entre los dos electrodos de la celda, al que se conoce como potencial de celda (E_{celda}), y se mide en Volts (Oropeza-Guzmán *et al.*, 2000). El potencial de celda es proporcional a la densidad de corriente impuesta en un sistema, sin embargo, esta respuesta depende en gran medida de las características de dicho sistema (Oropeza-Guzmán *et al.*, 2000).

En la figura 11 se presentan los resultados del potencial eléctrico o potencial de celda (V), en función de la densidad de corriente eléctrica (mA/cm²) impuesta en el reactor, en la que se evaluó el transporte iónico a través de la agrolita impregnada

con medio Pontecorvo, con 45 % y 55 % de humedad en el soporte, y en ausencia de *A. niger*.

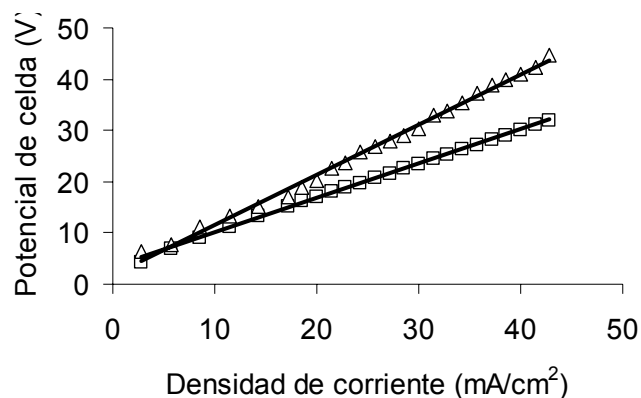


Figura 11. Potencial de celda obtenida al aplicar diferentes densidades de corriente (mA/cm²) en el reactor electroquímico con 45 (□) y 55% (Δ) de humedad inicial el soporte, se utilizaron electrodos de placa de titanio recubiertos con óxido de rutenio, área de electrodo 35 cm².

Con ambas humedades, se obtiene una respuesta lineal, sin embargo, debido a la cantidad de agua presente en el soporte, esta respuesta difiere, es decir, con un porcentaje de humedad del 45 %, se observa una mayor resistencia del sistema al paso de corriente que en aquella que tiene mayor cantidad de agua, 55 % (Fig. 11), esto es debido a que el agua es un compuesto que permite una mayor movilidad de los iones, por lo que se observa una mayor velocidad en el paso de corriente, y es consistente con los valores de conductividad observados (Oropeza-Guzmán *et al.*, 2000).

El paso de corriente a través de un sistema bajo la presencia de un potencial eléctrico, está controlado por la migración de los iones contenidos en él. La respuesta en la densidad de corriente a través de la agrolita es muy sensible a etapas acopladas a la transferencia de carga que modifiquen las condiciones de migración lineal a través de ella, esta respuesta es debida principalmente a las características de este sistema, como son; la actividad de los electrodos, la cantidad

de agua y de iones libres, la naturaleza del soporte, el tipo de electrolitos, así como de su concentración.

Dada la naturaleza del soporte utilizado (agrolita), material formado principalmente de silicatos y electroquímicamente inerte (Dogan *et al.*, 1997), ésta tiene una gran resistencia al paso de corriente, a pesar de estar embebida por una cantidad de agua y medio Pontecorvo (Tabla 1 y 2); el cual contiene una gran cantidad de sales, característica que lo haría un sistema con mayor conductividad. A pesar de la resistencia del sistema (Dogan *et al.*, 1997), esta caracterización permitió definir el intervalo de potencial de celda máximo (45 V) y mínimo (7 V) (Fig. 11), y las corrientes eléctricas (de 2.9 a 43 mA/cm²) a las cuales es posible trabajar en el reactor electroquímico. De éste intervalo de potencial y corriente, se eligieron los potenciales eléctricos y las densidades de corriente aplicadas a los cultivos de *A. niger* en la fase biótica. Cabe mencionar que la agrolita es un soporte inerte que tiene la capacidad de aislar térmicamente, protegiendo de los cambios bruscos de temperatura, ésta es una característica relevante en la aplicación de potenciales eléctricos de diferente magnitud sobre un sistema vivo, como es en este caso, protegiendo así al sistema de un sobrecalentamiento.

Dadas las reacciones electroquímicas en el sistema de fermentación, el que se utilizaron como electrolitos soporte NaOH y H₂SO₄ para el ánodo y cátodo, respectivamente; en el ánodo se generó una solución ácida debido a la producción de iones hidrógeno, y en el cátodo una solución alcalina por la presencia de iones hidroxilo. Este frente ácido se desplaza a través de todo el lecho hacia el cátodo y el frente alcalino hacia el ánodo (Fig.12). Cuando ambos frentes se encuentran se neutralizan uno a otro, esto provoca un cambio drástico del pH en la región entre el ánodo y el cátodo. Este salto en el pH está determinado por la movilidad relativa de los iones H⁺ y OH⁻ de un extremo a otro (Pamukcu and Wittle, 1992). En este sistema, el transporte de iones H⁺ hacia el cátodo y de iones OH⁻ hacia el ánodo determina la distribución de los valores de pH en el lecho de fermentación.

En general, se puede decir que el lecho de fermentación entre los dos electrodos está dividido en zonas; una de alto y una de bajo pH, formando de esta manera gradientes de pH (Probstein *et al.*, 1994).

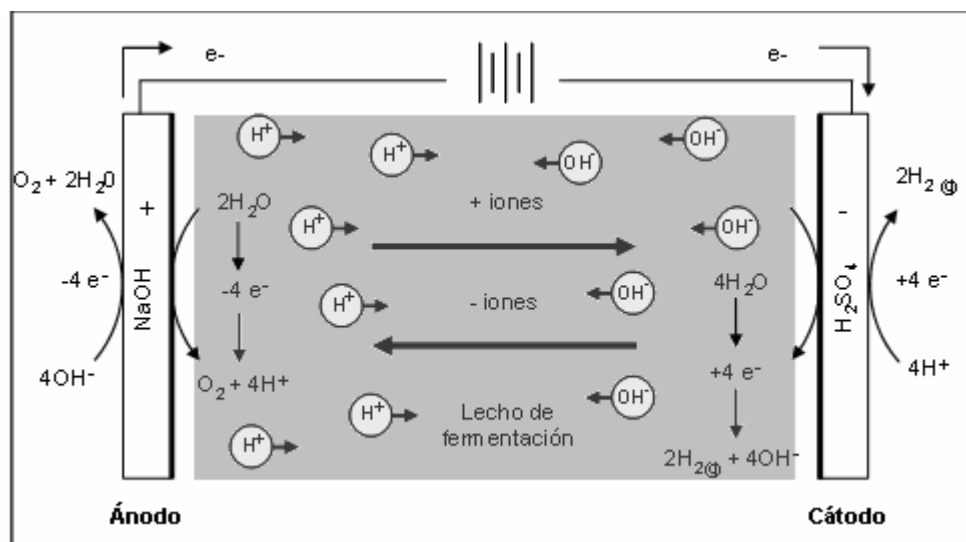


Figura 12. Fundamento electroquímico del reactor; electrodos de placa de titanio recubiertos con óxido de rutenio (área: 35 cm²); electrolitos soporte: NaOH (ánodo) y H₂SO₄ (cátodo).

Dadas las características del lecho de fermentación a partir de las reacciones electroquímicas y a que el pH es una variable importante en el marco de este trabajo, ya que de él depende la producción y estabilidad de la invertasa, fue necesario tener un control en la formación de gradientes de pH en el sistema durante los cultivos en la etapa biótica, a partir de la modificación de la concentración de los electrolitos soporte utilizados.

7.2.3 Conclusiones parciales

La voltamperometría cíclica es una técnica que permitió observar la capacidad de óxido-reducción de la superficie de los electrodos. A partir de la observación de un patrón característico en el barrido de esta técnica, se logró determinar la calidad de los electrodos, y con ello, su selección, para su utilización en la determinación del

potencial de celda del reactor y durante la segunda etapa (biótica) de este estudio, en la que se aplicaron potenciales eléctricos de baja magnitud a diferentes condiciones de experimentación.

A pesar de la resistencia del sistema, se obtuvo el potencial de celda correspondiente a cada intensidad de corriente impuesta, en los dos contenidos de humedad analizados (45 y 55 %), mostrando como respuesta en ambos casos, una función lineal que permitió la selección de voltaje y de intensidad de corriente a los cuales fueron sometidos los ensayos de la etapa biótica. Se logró la selección de los electrolitos soporte así como su concentración para el control de las reacciones electroquímicas, y de esta manera evitar la obtención de gradientes de pH en todo el lecho de fermentación que repercutan en la estabilidad de la invertasa.

7.3. Efecto de la aplicación del potencial eléctrico sobre el metabolismo de *A. niger*

7.3.1. Efecto del potencial eléctrico a voltaje-corriente variable y voltaje constante sobre el crecimiento de *A. niger*

Una vez establecidas las condiciones tanto del proceso de fermentación en medio sólido, como son: el tiempo (35 h) y la humedad inicial del medio de cultivo en el sistema (55 %), así como las condiciones electroquímicas de operación del reactor electroquímico, en las que se definieron tanto el potencial eléctrico como la corriente eléctrica aplicada, en esta última sección se describen y evalúan los ensayos aplicando potenciales eléctricos de baja magnitud sobre la cepa de *A. niger*.

7.3.1.1. Producción de CO₂

Para fines de este trabajo, en el que se pretende evaluar el impacto del proceso electroquímico sobre el metabolismo de un hongo filamentoso de importancia

biotecnológica como es *A. niger*, y posiblemente establecer algunos de los procesos fisiológicos que de él pudiesen estar siendo afectados por el potencial eléctrico, se hace necesario evaluar los principales parámetros del crecimiento microbiano.

El crecimiento microbiano puede evaluarse indirectamente a través de la producción de CO₂ (Saucedo *et al.*, 1994), en este proceso se obtiene una curva que puede dividirse en distintas fases: de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte. En este estudio, se evaluaron tanto la fase de latencia o germinación (en hongos filamentosos), como la fase de crecimiento rápido o tasa específica de crecimiento (μ). La fase de latencia o de germinación (*lag*) es una fase en la que el crecimiento no comienza inmediatamente, ya que los microorganismos se adaptan a las nuevas condiciones (Atlas, 1989; Madigan *et al.*, 2004).

En la figura 13A se presenta la velocidad máxima de producción de CO₂ con sacarosa como única fuente de carbono (200 mg/gss) por *A. niger* en función del potencial eléctrico aplicado (voltaje-corriente variable), con intervalo de voltaje de 0-15.5 V, 35 h de cultivo y 55 % de humedad inicial del soporte. La velocidad máxima de producción de CO₂ fue de 6.0 mgCO₂/gss h, y se obtuvo en ausencia de potencial eléctrico (0 V). Esta velocidad de producción de CO₂ disminuye considerablemente al someter el cultivo a potenciales eléctricos de 10.5 y 15.5 V, mostrando valores de 4 mgCO₂/gss h, por lo que se deduce, que la aplicación de potenciales eléctricos de esta magnitud, desfavorecen el crecimiento de *A. niger*, en estas condiciones de estudio.

Por otro lado, en la figura 13B se presenta la velocidad máxima de producción de CO₂ por *A. niger* en función del potencial eléctrico (a voltaje constante) aplicado, con intervalo de potencial eléctrico de 0-10.5 V. La velocidad máxima de producción de CO₂ determinada fue de 7.0 mgCO₂/gss h, y se obtuvo al aplicar un potencial eléctrico de 2.5 V, sin embargo, este valor es similar al obtenido en ausencia de potencial, ya que en este ensayo la velocidad de producción de CO₂, fue de 6.0

mgCO₂/gss h. Este resultado es similar a lo reportado por Nuñez (2004), en el que se encontró que para una concentración de sacarosa de 200 mg/gss, con un contenido de humedad del 42 %, la máxima producción de CO₂ fue de 6.0 mgCO₂/gss h, en espuma de poliuretano (PUF) como soporte inerte.

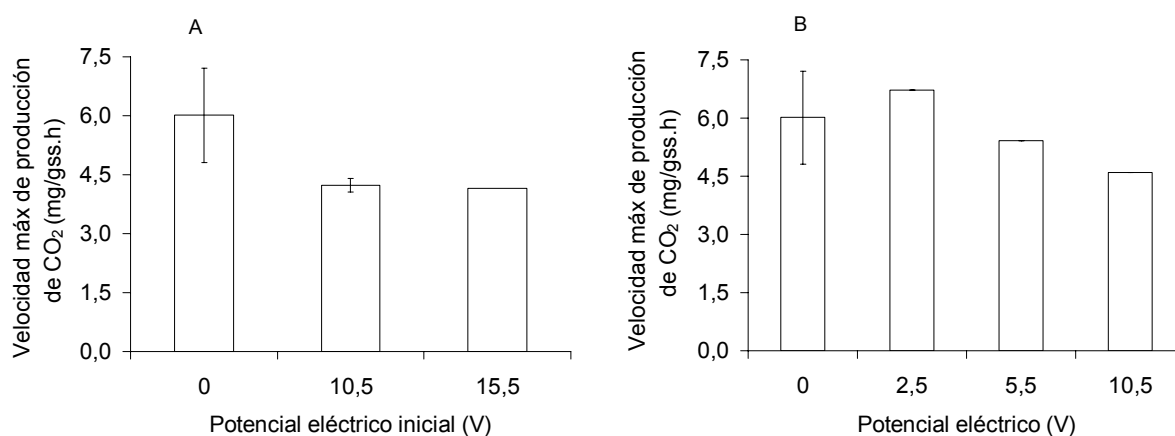


Figura 13. Velocidad máxima de producción de CO₂ por *A. niger* a 35h de cultivo, en función del potencial eléctrico aplicado; A) voltaje-corriente variable y B) voltaje constante (ensayos realizados por triplicado).

La producción de CO₂ disminuye ligeramente al aumentar el potencial eléctrico hasta 10.5 V, obteniendo valores de alrededor de 4.5 mgCO₂/gss h (Fig.13B). Estos resultados difieren de un estudio con glucosa como única fuente de carbono, realizado por Mendoza *et al.*, (2003), en el que reportan que la velocidad máxima de producción de CO₂, se ve favorecida al aplicar un potencial eléctrico con diferentes magnitudes que van desde 5 hasta 12.5 V, mostrando un aumento en la velocidad producción de CO₂ al incrementar la magnitud de dicho potencial.

En la figura 14A se presentan los valores de producción de CO₂ a las 35 h de cultivo, en función del potencial eléctrico aplicado (a voltaje-corriente variable), con intervalo de 0-15.5 V. La máxima producción de CO₂ acumulado fue de 72 mgCO₂/gss, y se obtuvo a 0 V, el CO₂ acumulado disminuye considerablemente hasta valores de 60 y 56 mgCO₂/gss, cuando se aplican potenciales de 10.5 y 15.5 V, respectivamente.

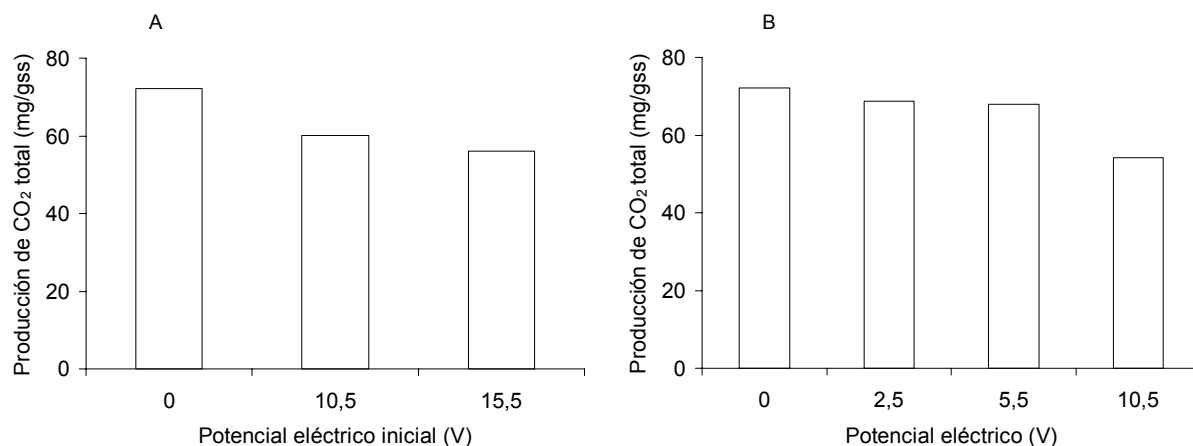


Figura 14. Producción de CO₂ total por *A. niger* a 35 h de cultivo, en función del potencial eléctrico aplicado; A) voltaje-corriente variable y B) voltaje constante.

Con un comportamiento similar, en la figura 14B se presenta el CO₂ acumulado a las 35 h de cultivo, en función del potencial eléctrico aplicado (a voltaje constante), con un intervalo de potencial de 0-10.5 V, donde la mayor producción de CO₂ acumulado (72 mgCO₂/gss), se obtuvo a 0V, al igual que en los ensayos con voltaje-corriente variable, la producción total de CO₂ disminuye ligeramente al someter a los cultivos a un potencial eléctrico, mostrando una disminución progresiva al incrementar dicho potencial, 2.5 V y 5.5 V, de 68.7 y 67.8 mgCO₂/gss, respectivamente.

Por otro lado, la producción total de CO₂ se ve notablemente afectada cuando se aplica un potencial eléctrico de 10.5 V (54 mgCO₂/gss). Estos resultados son diferentes a los obtenidos por Mendoza *et al.*, (2003), en el que reportan que el CO₂ acumulado se ve favorecido al aplicar un potencial eléctrico con diferente magnitud (5-12.5 V), denotando un aumento en la producción total de CO₂ al incrementar la intensidad del potencial eléctrico hasta 12.5 V; sin embargo, el máximo valor de CO₂ determinado en este trabajo fue de 38.8 mgCO₂/gss, dos veces menor a la obtenida con sacarosa.

Cabe señalar, que el patrón de respuesta tanto en la aplicación de potenciales eléctricos con voltaje-corriente variable y a voltaje constante fueron similares en la

producción total de CO₂; sin embargo, el aplicar un potencial eléctrico a voltaje constante se tiene una ventaja sobre la velocidad de producción de CO₂, ya que en forma general, se observa que la velocidad de producción de CO₂ se favorece más que con la aplicación de potenciales eléctricos con magnitud variable.

7.3.1.2. Fase de germinación

A partir de las cinéticas de producción de CO₂, se obtuvieron tanto la duración de la fase de germinación para *A. niger* (fase *lag*), como la tasa específica de producción de CO₂, equivalente a la tasa específica de crecimiento (μ), en función del potencial aplicado a los cultivos.

En la figura 15 se muestra el tiempo de duración de la fase de germinación en función del potencial eléctrico aplicado, tanto a voltaje-corriente variable como a voltaje constante. En la figura 15A se observa que la duración de la fase *lag* aumenta ligeramente al aumentar el potencial eléctrico, hasta alcanzar un valor de retardo de 15 h, por lo que se concluye que los potenciales eléctricos de ésta magnitud (10.5 y 15.5 V), a voltaje-corriente variable, no disminuyen el tiempo de germinación de *A. niger*, ya que son similares al determinado en ausencia de potencial (0 V).

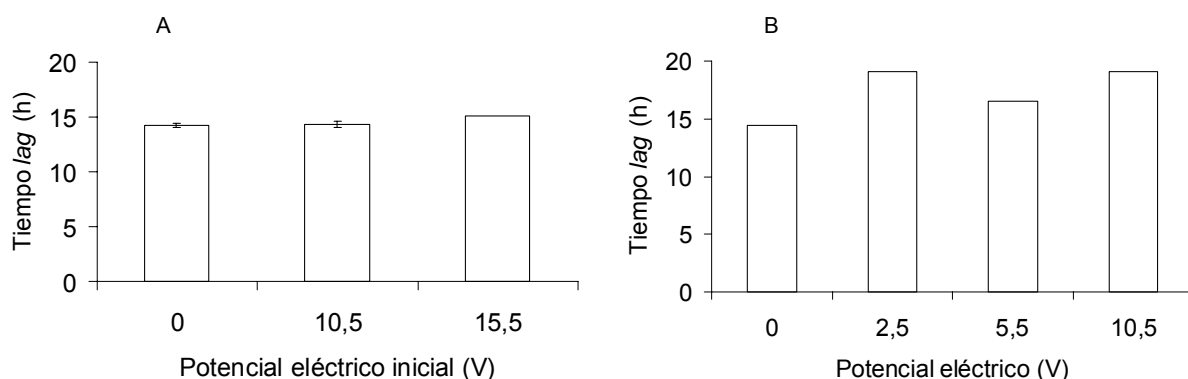


Figura 15. Duración de la fase de germinación (*lag*) de *A. niger* a 35 h de cultivo, en función del potencial eléctrico aplicado; A) voltaje-corriente variable y B) voltaje constante, (ensayos realizados por triplicado).

En la figura 15B se presenta el efecto del potencial eléctrico a voltaje constante sobre el tiempo de duración de la fase de germinación de *A. niger*, el menor tiempo de duración de esta fase fue de 14 h, y se obtuvo en ausencia de potencial, este resultado es similar a lo reportado por Nuñez (2004), en el que encuentran un tiempo de germinación de 14 h para *A. niger* en cultivos con sacarosa; por el contrario, esto difiere con lo reportado por Mendoza *et al.*, (2003), en el que definen un tiempo de germinación para esta misma cepa en cultivos con glucosa de 22 h.

El tiempo de germinación para *A. niger*, en estas condiciones de estudio, es decir, en presencia de potenciales eléctricos de baja magnitud a voltaje constante se retarda al incrementar dicho potencial, encontrando valores de hasta 19 h, en 2.5 y 10.5 V, sin embargo, a un voltaje de 5.5 V, esta fase es estimulada ligeramente, ya que disminuye a 16 h. Estos resultados son congruentes con lo demostrado en un estudio realizado por Mendoza *et al.*, (2003), en el que se reporta que la fase de germinación *lag* para *A. niger*, se ve favorecida por la aplicación de un potencial eléctrico de 5 V, disminuyendo considerablemente el tiempo de esta fase a 15 h.

7.3.1.3. Tasa específica de crecimiento

En la figura 16A se presentan los valores de μ obtenidos para *A. niger* en presencia de potencial eléctrico a voltaje-corriente variable (0-15.5 V). Estos valores fueron obtenidos a partir del ajuste de los datos de producción de CO₂ en función del tiempo, con la aplicación de la ecuación logística, que describe el crecimiento microbiano. Se observa que el máximo valor para este parámetro (0.17 h⁻¹), se obtiene en ausencia de potencial, y disminuye ligeramente al incrementar el potencial aplicado, 10.5 y 15.5 V, (0.11 y 0.12 h⁻¹, respectivamente). Los potenciales eléctricos a voltaje-corriente variable son desfavorables en el crecimiento exponencial de *A. niger*.

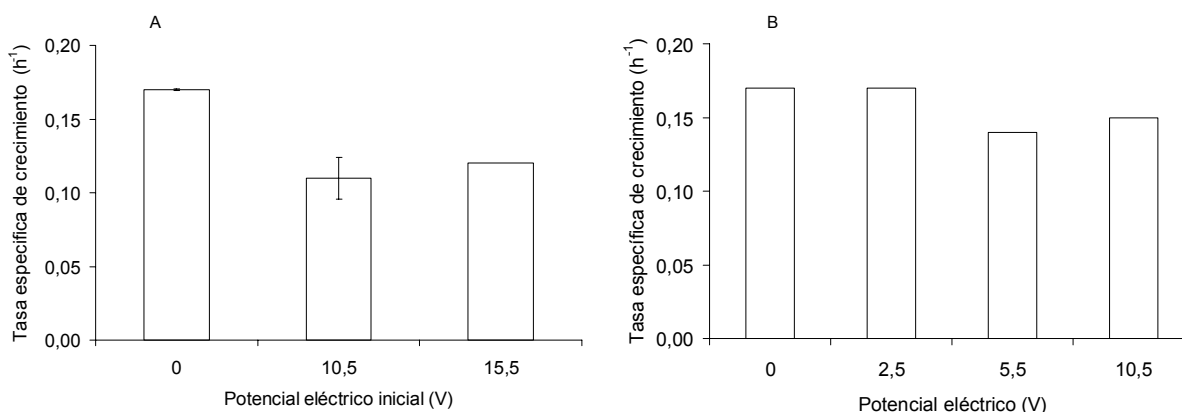


Figura 16. Tasa específica de crecimiento de *A. niger* a 35 h de cultivo, en función del potencial eléctrico aplicado; A) voltaje-corriente variable y B) voltaje constante, (ensayos realizados por triplicado).

La figura 16B muestra la tasa específica de crecimiento en función del potencial aplicado a voltaje constante (0-10.5 V). En ella se observa que el mayor valor de μ obtenido ($0.17 h^{-1}$), se presentó tanto en ausencia de un potencial eléctrico como al aplicar 2.5 V, esta μ , decrece ligeramente cuando el potencial es incrementado hasta 5.5V ($0.14 h^{-1}$). Estos resultados coinciden con lo reportado por Mendoza *et al.*, (2003) en el que se muestra que el valor de μ (con glucosa como fuente de carbono) para potenciales similares (5-12.5 V) a los evaluados en este estudio fue de $0.17 h^{-1}$. Por lo que se concluye que la aplicación de potenciales eléctricos a voltaje constante de esta magnitud, no favorecen la velocidad de crecimiento de *A. niger*.

Comparando la aplicación de potenciales eléctricos a voltaje-corriente variable con los de potencial constante, se concluye que dicha aplicación sobre los parámetros de crecimiento para *A. niger* en ambos casos es desfavorable; sin embargo, se observa una respuesta diferente al aplicar potenciales eléctricos con un voltaje constante, mostrando valores tanto de tiempo *lag* como de μ mayores a los obtenidos a voltaje-corriente variable.

7.3.1.4. Producción de invertasa

La cepa de *A. niger* fue capaz de producir extracelularmente la actividad β -D-fructofuranosidasa al someterla a un cultivo con sacarosa (200 mg de sacarosa/gss) como única fuente de carbono, en ausencia y presencia de potenciales eléctricos de baja magnitud (0-15.5 V).

En la figura 17A se presenta la actividad enzimática en función de la distancia que existe entre electrodos en el sistema fermentativo, al aplicar diferentes potenciales eléctricos a voltaje-corriente variable. Se observa que la mayor actividad invertasa (10.5 UI/gss) se presenta prácticamente en todo el lecho de fermentación (0-7, 7-14 y 14-21cm), y se obtuvo en ausencia de potencial eléctrico (0 V). Esta actividad enzimática permanece constante en la zona catódica del reactor, pero disminuye ligeramente en la zona media hasta obtener valores de 7 UI/gss al incrementar el potencial impuesto; sin embargo, realizando un análisis de varianza (ANOVA) en cada zona del reactor, para la producción enzimática en función del potencial eléctrico aplicado, se demuestra que no existen diferencias significativas (α 0.05), tanto en la parte media del reactor (7-14 cm) como en la zona catódica (14-21cm).

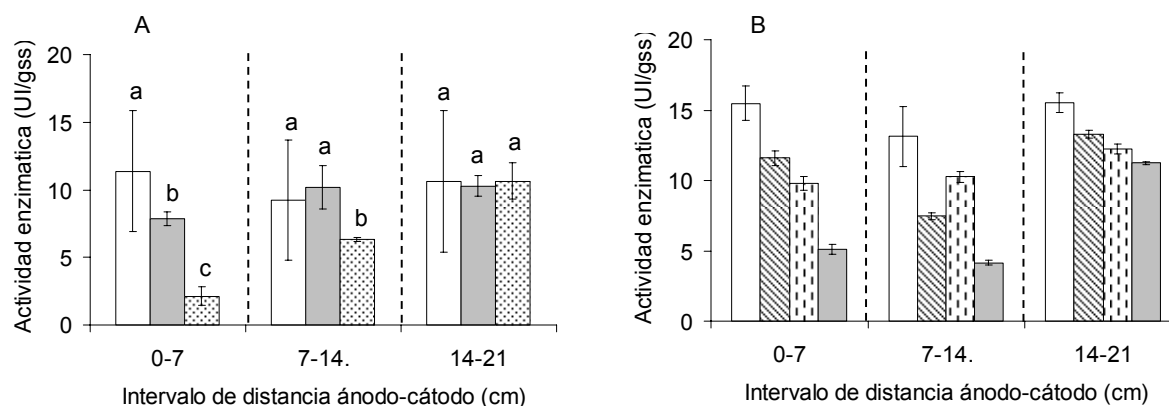


Figura 17. Producción de invertasa por *A. niger* a 35 h de cultivo, en función del potencial aplicado; A) voltaje-corriente variable y B) voltaje constante, □ 0 V, ▨ 2.5 V, ▤ 5.5 V, ■ 10.5 V, ▩ 15.5 V. Los valores con diferente notación (a, b, c) presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) (ensayos realizados por triplicado).

Por el contrario, para la zona anódica (0-7cm), la actividad enzimática disminuye significativamente al incrementar el potencial aplicado (0-15.5 V), obteniendo una disminución de 10 hasta 2 UI/gss, respectivamente (Anexo 6). Este comportamiento de la actividad invertasa, es debido principalmente a la reacción electroquímica que se lleva a cabo en esta zona del reactor (ánodo), reacción anódica: $2\text{H}_2\text{O} - 4\text{e}^- \leftrightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+$, en la que se lleva a cabo la hidrólisis del agua, produciendo una alta concentración de protones (H^+) y que, a pesar de tratar de evitar cambios de pH con el electrolito en el compartimiento anódico (0.1 M NaOH), se provocó un cambio desfavorable en el pH del medio (Fig. 18A); el cual, se vuelve más ácido a la vez que se incrementa el potencial impuesto.

Dados los valores de pH encontrados en esta zona del reactor (ánodo) en ambas condiciones de experimentación (voltaje-corriente variable y voltaje constante), la producción de invertasa suele ser baja, ya que a valores ácidos, se pierde la estabilidad de la enzima, de acuerdo con lo reportado por Núñez (2004) para *A. niger*; el pH óptimo para la producción de invertasa es cercano a la neutralidad; sin embargo, en otros estudios, se ha informado un pH óptimo de 5.5 unidades para el crecimiento diversos hongos filamentosos (Boddy *et al.*, 1993). Es importante mencionar que los cambios en los valores de pH en este extremo del sistema están sujetos tanto al tipo de electrolito utilizado, como a su concentración y a la velocidad a la cual las reacciones electroquímicas se llevan a cabo.

En la figura 17B se observa un patrón similar de actividad enzimática en cuanto al comportamiento de la actividad enzimática al aplicar un potencial a voltaje constante, pero no en cuanto a su actividad, ya que ésta suele ser más alta en estos ensayos, con respecto a lo que se obtuvo en los ensayos a voltaje-corriente variable. En esta figura se observa que la mayor actividad enzimática obtenida (13-15 UI/gss) es nuevamente determinada en ausencia de potencial (0 V), y se observa en todo el lecho de fermentación. Esta actividad enzimática disminuye al incrementar el

potencial eléctrico en un intervalo de 2.5-10.5 V, este comportamiento es observado en los tres puntos del lecho de fermentación analizados (0-7, 7-14, y 14-21cm).

Al aplicar un potencial de 2.5 V, la actividad enzimática obtenida fue de 11, 7, y 13 UI/gss. Al aplicar 5.5 V los resultados de actividad son 9, 10 y 12 UI/gss, y al aplicar 10.5 V se obtuvo una actividad de 5, 4, y 11 UI/gss., en las fracciones 7, 14, y 21 cm del reactor, respectivamente (Fig.17B). Este comportamiento de heterogeneidad en la producción de la enzima es debida principalmente al efecto del paso de la corriente a través del lecho de fermentación, y más precisamente sobre la cepa de *A. niger*, que ocasiona diferentes efectos dependiendo de la cercanía o lejanía de los electrodos, que son el material que suministra la corriente eléctrica impuesta a partir de un potencial eléctrico dado.

Al igual que en los ensayos con voltaje-corriente variable (Fig. 17A), en la zona anódica de los ensayos con voltaje constante (Fig. 17B), la actividad enzimática disminuye al incrementar el potencial eléctrico, observando valores de 15.5, 11.6, 9.8 y 5.1 UI/gss, para 0, 2.5, 5.5 y 10.5 V, respectivamente. Esto es debido como ya se mencionó anteriormente a los cambios de pH, relacionados a la reacción electroquímica (electrólisis) llevada a cabo en esa zona del reactor electroquímico.

Cabe señalar que en estos ensayos (Fig. 17B) no se realizó el análisis estadístico, ya que solo es un ensayo experimental para cada potencial aplicado, las barras de error mostradas corresponden al error del ensayo enzimático. Es importante mencionar que los resultados presentados para los ensayos de 0 V, se realizaron en diferentes tiempos, por lo que difieren en cada condición experimental (voltaje-corriente variable y voltaje constante).

Como ya se mencionó, en los sistemas de fermentación cuando una de las principales variables es la producción y actividad de una enzima, la concentración de protones desempeña una función muy importante, ya que la estabilidad enzimática es mejor cuando ésta es óptima en el medio de fermentación.

En la figura 18A se muestra el perfil de pH al final de cada cultivo en función de la distancia existente entre ánodo-cátodo, bajo el estímulo de potenciales eléctricos a voltaje y corriente variable. Los valores más altos de pH obtenidos fueron 7.5-8 unidades, y se obtuvieron en los ensayos a 0 V y al aplicar potenciales eléctricos (10.5 y 15.5 V), tanto en la zona media, como en la zona catódica del reactor. Al realizar el análisis estadístico, se observa que no existen diferencias significativas (α 0.05) entre los potenciales aplicados en cada una de estas zonas. Sin embargo, en el extremo anódico los valores de pH tuvieron una variación considerable con diferencias significativas entre dichos potenciales, ya que el pH disminuye al incrementar el potencial eléctrico aplicado, hasta alcanzar valores de hasta 4 unidades (Anexo 7). Esto es debido principalmente a que en el compartimiento anódico, la concentración de NaOH para contrarrestar la producción de protones no fue suficiente, por lo que la migración de éstos se llevó a cabo de manera importante que originó un cambio en la diferencia de potencial y la magnitud, haciendo que la migración de protones sea cada vez sea más lenta al incrementar el potencial impuesto, por lo que se refleja en la acumulación de los mismos en esta zona del reactor (anódica).

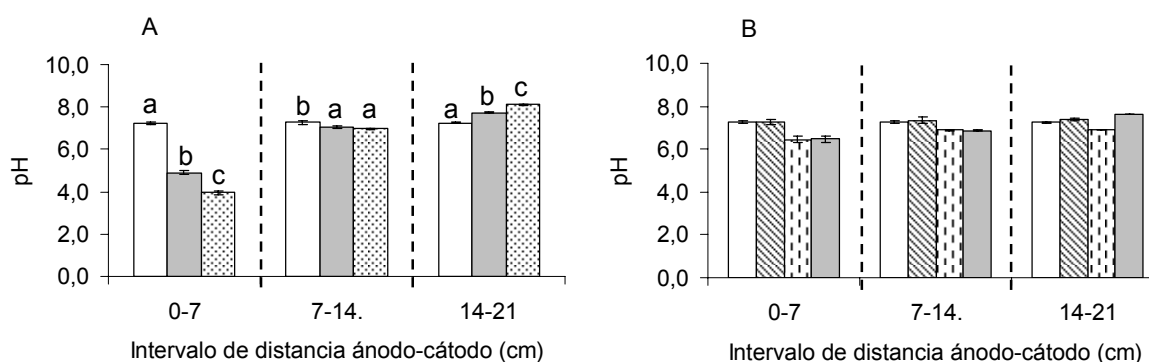


Figura 18. Valores de pH al final del cultivo (35 h), en función del potencial eléctrico aplicado; A) voltaje-corriente variable y B) voltaje constante, □ 0V, ▨ 2.5V, ▩ 5.5V, ■ 10.5V, ▤ 15.5V. Los valores con diferente notación (a, b, c) presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) (ensayos realizados por triplicado).

Por otro lado, en la figura 18B se observan los valores de pH al final de cada cultivo, correspondiente a los ensayos realizados bajo el estímulo de un potencial eléctrico a voltaje constante. Dado que en estos ensayos, se realizó la modificación de la concentración del electrolito (NaOH de 0.1 a 0.2 M) contenido en el extremo anódico, se logró un mayor control de los cambios de pH en esta zona del sistema.

En esta figura también se muestra la homogeneidad entre las 3 fracciones evaluadas para cada ensayo, en donde el mayor valor de pH obtenido, fue de 7.7 unidades, para todos los casos. De acuerdo a lo descrito por Nuñez (2004), estos valores de pH son óptimos para la estabilidad de la invertasa por *A. niger*, ya que en este estudio, se determinó una mayor estabilidad de invertasa a un pH cercano a la neutralidad.

La necesidad de que el pH no varíe demasiado o no cambie drásticamente, radica en la alteración que puede sufrir la estructura de la enzima y/o del sustrato al incrementar o disminuir las unidades de pH en el medio de fermentación, reflejándose en la medición de la actividad enzimática del microorganismo. Para lograr un mejor control del pH a través de toda la celda y poder garantizar la estabilidad de la invertasa, se modificó la concentración del electrolito en el compartimiento anódico, aumentando la concentración de 0.1 a 0.2 M de NaOH, a modo de controlar el cambio de acidez en el medio en la zona anódica. En la zona catódica de este sistema, en la que se lleva a cabo la reacción: $4\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \leftrightarrow 2\text{H}_2(\text{g}) + 4\text{OH}^-$, también se logró aumentar la actividad enzimática, limitando la concentración de OH^- formados con una nueva concentración de ácido sulfúrico (2 M). Con ello, se comprueba que la baja actividad enzimática en la zona anódica del sistema a potenciales de 0-15.5 V, a voltaje-corriente variable, se debe a los cambios generados en el pH por el efecto de las reacciones electroquímicas llevadas a cabo en esa zona del reactor y no al efecto de los campos eléctricos sobre la cepa de *A. niger*.

7.3.1.5. Azúcares reductores

El análisis de sacarosa y azúcares reductores al final de la fermentación permite evaluar la hidrólisis *in situ* de la sacarosa y el consumo de azúcares reductores generados por la invertasa producida. Dado que la sacarosa es un disacárido, al ser hidrolizada por la enzima invertasa, ésta se divide formando azúcares reductores: glucosa y fructosa en concentraciones equimolares. A partir de esta característica, fue posible determinar indirectamente la hidrólisis del sustrato con la determinación de la concentración final de azúcares reductores liberados. La concentración inicial de sacarosa utilizada en todos los ensayos fue de 200 mg/gss.

En la figura 19 se presenta la concentración de azúcares al final de la fermentación, en función del potencial eléctrico aplicado (voltaje-corriente variable) y de la distancia entre electrodos (ánodo-cátodo). En esta figura se observa que en ausencia de potencial, es decir a 0 V, la concentración final de sacarosa es de 8 mg/gss y se observa tanto en el extremo anódico, como en el extremo catódico; sin embargo, en la parte media del reactor (7-14 cm), se observa una mayor concentración de sacarosa (14 mg/gss), esta diferencia de concentraciones se puede deber a el calor metabólico acumulado en esta zona del reactor durante el cultivo, mismo que podría limitar el crecimiento de *A. niger* y consecuentemente la producción y actividad de la invertasa, haciendo que la reacción de hidrólisis del sustrato sea menor.

En general, los ensayos realizados a 0 V presentan una hidrólisis parcial de sacarosa en ambos extremos del reactor (96 % aproximadamente), con respecto a la concentración inicial de sacarosa en el medio de cultivo (200 mg/gss). En dichos ensayos, se demuestra que la velocidad de consumo de los azúcares reductores liberados (glucosa y fructosa), es mayor a la velocidad de hidrólisis de sacarosa. Sin embargo, en el extremo anódico se observa una concentración de fructosa de 2 mg/gss, misma que podría deberse a la forma de metabolismo de *A. niger*. Cabe

señalar, que la hidrólisis de sacarosa en estos ensayos (0 V) no fue total (100 %), esto es debido al tiempo de cultivo seleccionado en este trabajo (35 h).

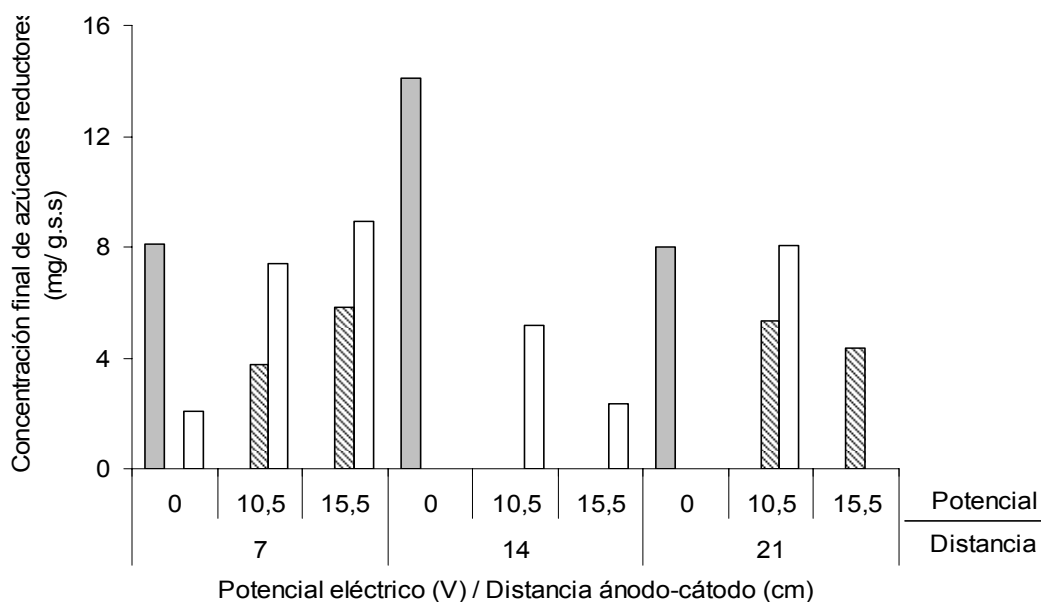


Figura 19. Concentración final de azúcares reductores, en función del potencial aplicado a voltaje-corriente variable; ■ sacarosa, ▨ glucosa, □ fructosa; (concentración inicial de sacarosa, 200 mg /gss; 55 % humedad y 35 h de cultivo).

Al aplicar potenciales eléctricos de bajo voltaje como 10.5 y 15.5 V, se observa que hay un cambio considerable en la hidrólisis de sacarosa, ya que con respecto a 0 V, la hidrólisis del sustrato aumentó al incrementar el potencial eléctrico aplicado, reflejándose en la acumulación de azúcares reductores. La acumulación de azúcares reductores en el medio de cultivo en las condiciones evaluadas en este trabajo, demuestra que la velocidad de hidrólisis de sacarosa es mayor a la de consumo de los reductores generados (glucosa y fructosa). Sin embargo; en la parte media del reactor, en ambos potenciales (10.5 y 15.5 V) sólo se observa la presencia de fructosa (2 y 5 mg/gss, respectivamente), esto puede ser debido a que en esta zona del reactor, que está alejada de los electrodos, el potencial eléctrico al que están sometidos los microorganismos es muy diferente. Además de que en el metabolismo

microbiano se favorece más el consumo de glucosa que el de fructosa, por ser una molécula pequeña que puede ser introducida con facilidad a la célula.

En ambas condiciones experimentales se observa que la hidrólisis de sacarosa (inicial 200 mg/gss), se lleva a cabo en su totalidad en todo el lecho de fermentación (7-21cm), durante el tiempo de cultivo por la acción de la invertasa, por lo que se deduce que los potenciales eléctricos de esta magnitud a las condiciones de estudio evaluadas, favorecen la hidrólisis de sacarosa.

De la misma manera, en la figura 20 se presenta la concentración de azúcares reductores al final de la fermentación, en función del potencial eléctrico aplicado (voltaje constante) y de la distancia ánodo-cátodo que existe en el reactor.

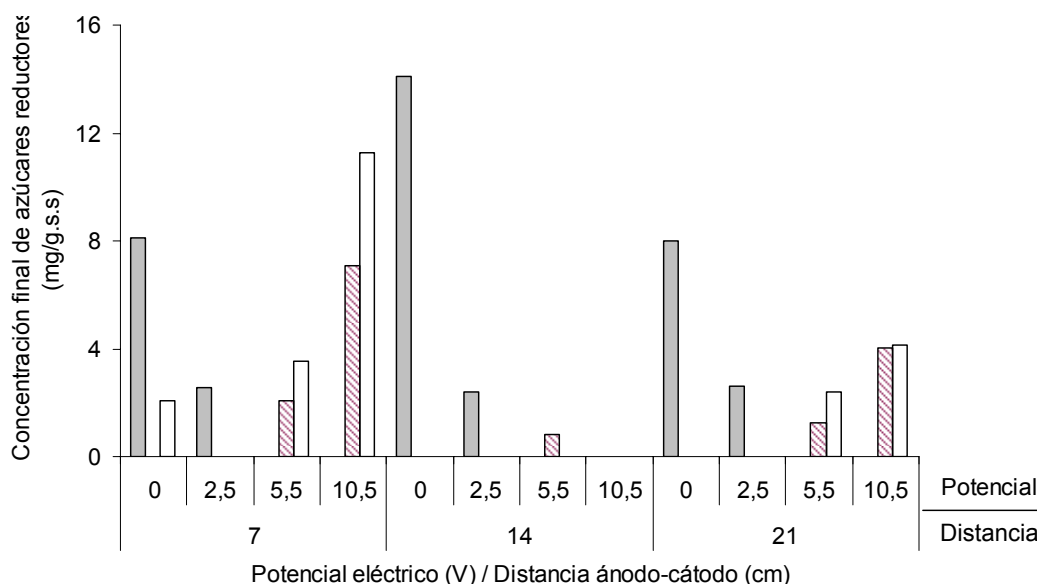


Figura 20. Concentración final de azúcares reductores en función del potencial aplicado a voltaje constante; ■ sacarosa, ▨ glucosa, □ fructosa; (concentración inicial de sacarosa, 200 mg /gss; 55 % humedad y 35 h de cultivo).

Al igual que a voltaje-corriente variable, en esta figura se observa que en ausencia de potenciales eléctricos a voltaje constante, se lleva a cabo una hidrólisis parcial de sacarosa del 96 % aproximadamente. La hidrólisis de sacarosa aumenta al

incrementar el potencial eléctrico (de 2.5 a 10.5 V); sin embargo al aplicar un potencial de 2.5 V, la hidrólisis de sacarosa es del 98% con una concentración de sacarosa residual de 2 mg/gss. Al aplicar potenciales eléctricos del orden de 5.5 y 10.5 V, se observa una hidrólisis total de sacarosa, reflejándose en la proporción de acumulación de azúcares reductores liberados.

En ambos casos, tanto en la aplicación de potenciales eléctricos a voltaje-corriente variable y voltaje constante, se observó que éstos no estimulan la producción de invertasa; sin embargo, se observa un efecto notablemente favorable sobre su actividad catalítica, lo que conduce a un mayor grado de hidrólisis de sacarosa ($\approx 100\%$), y por lo tanto a una mayor acumulación de azúcares reductores, bajo las condiciones de estudio.

7.3.1.6. Factores fisicoquímicos que influyen en el crecimiento de *A. niger* bajo el estímulo de un potencial eléctrico

En los cultivos microbianos, así como en las fermentaciones sólidas, existen algunos parámetros que influyen en el crecimiento de los microorganismos, como el pH, la humedad, la disponibilidad de agua y de importancia en este estudio, la conductividad eléctrica.

Para fines de este trabajo, también fue evaluada la concentración de iones (conductividad eléctrica $\text{-mS/cm}^2\text{-}$) presentes en el lecho de fermentación y su comportamiento bajo el estímulo de potenciales eléctricos de baja magnitud. En la figura 21 A y B, se muestran los perfiles de conductividad (en función de la distancia entre electrodos) correspondientes a los ensayos a voltaje-corriente variable y voltaje constante, respectivamente.

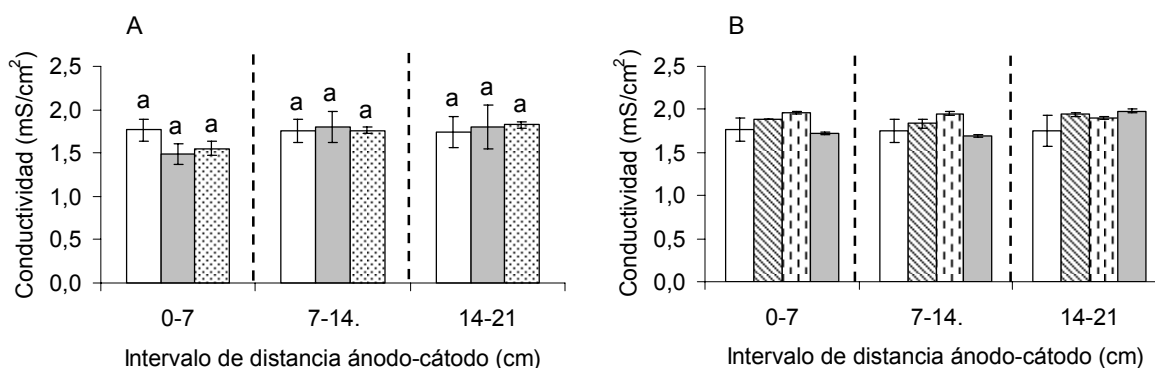


Figura 21. Valores de conductividad eléctrica (mS/cm^2) al final del cultivo (35 h) en función del potencial eléctrico aplicado; A) voltaje-corriente variable y B) voltaje constante, \square 0 V, ▨ 2.5 V, ▩ 5.5 V, ■ 10.5 V, ▤ 15.5 V. Los valores con diferente notación (a, b, c) presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) (ensayos realizados por triplicado).

En esta figura se observa que para las dos condiciones de estudio planteadas, la mayor conductividad eléctrica fue de alrededor de $1.7 \text{ mS}/\text{cm}^2$, y se obtuvo tanto en ausencia como en presencia de potencial, y en las que no se observaron diferencias significativas ($\alpha 0.05$) (Anexo 8), por lo que la concentración de iones no se ve afectada por la aplicación de un potencial eléctrico de esta magnitud, es decir, que la cantidad de iones componentes del medio de cultivo, la cantidad de agua y la concentración de esporas presentes en el sistema, siempre es la misma en todo el lecho de fermentación, independientemente de la ausencia o presencia de un potencial eléctrico, con lo que se asegura la disponibilidad de nutrientes y agua, necesarios para el crecimiento de las esporas de *A. niger*.

En este análisis, la actividad de agua es un parámetro importante, no sólo por tratarse de una fermentación en medio sólido, si no porque al tratarse de la aplicación de un potencial eléctrico, implica la generación de calor en el lecho de fermentación durante el tiempo de cultivo, por lo cual, este parámetro indica la cantidad de agua disponible, o mejor dicho el secado del sistema.

La actividad de agua (a_w) en un sustrato, es la cantidad de agua libre disponible para el metabolismo microbiano, este parámetro importante en las fermentaciones en

medio sólido, está estrechamente relacionado con el contenido de humedad del soporte (Lu *et al.*, 2003), un valor bajo de agua a_w , ocasionará la disminución de la disponibilidad de agua para el metabolismo microbiano, por lo tanto dificultará la transferencia de masa, la asimilación y conversión del sustrato (Pandey *et al.*, 1994).

En la figura 22 A y B se muestran los perfiles de la actividad de agua al finalizar los cultivos en función de la distancia ánodo-cátodo en el reactor, tanto para los ensayos a voltaje-corriente variable como para voltaje constante. La actividad de agua encontrada en todos los ensayos fue de 0.98, y en el que no hay diferencias significativas (α 0.05) con respecto a los potenciales eléctricos aplicados en ambas condiciones de estudio (Anexo 9). Este valor de actividad de agua, corresponde a lo descrito por Mitchell *et al.*, (2000), como un valor de a_w óptimo para el crecimiento de *A. niger*.

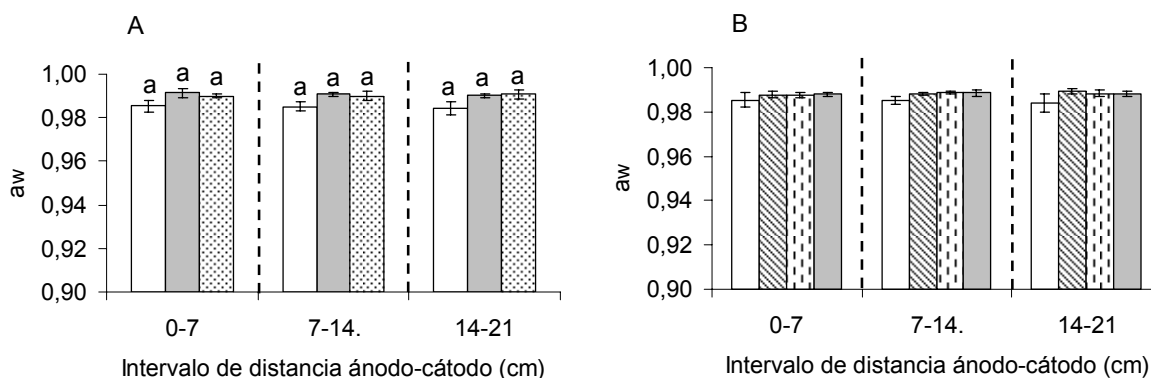


Figura 22. Valores de actividad de agua (a_w) al final del cultivo (35h) en función del potencial eléctrico aplicado; A) voltaje-corriente variable y B) voltaje constante, □ 0 V, ▨ 2.5 V, ▤ 5.5 V, ■ 10.5 V, ▩ 15.5 V. Los valores con diferente notación (a, b, c) presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) (ensayos realizados por triplicado).

Al igual que la a_w , la cantidad de agua presente (humedad) en los sistemas de fermentación sólida, es uno de los factores más importantes (Mitchell *et al.*, 2000; Gervais and Molin, 2003). La cantidad de agua depende de la composición del medio de cultivo y de la interacción del agua con el soporte sólido. Si el contenido de humedad del medio de cultivo es bajo, la película de agua que rodea a los

microorganismos será muy delgada, ocasionando que los espacios entre las partículas del soporte estén ocupados por aire, lo que aumenta la transferencia de oxígeno y favorece el metabolismo aeróbico (Oostra *et al.*, 2001). En este caso, los nutrientes solubles estarán más concentrados debido al bajo contenido de agua en el medio.

Por otro lado, si el contenido de humedad del medio de cultivo es alto, la película de agua que rodea al microorganismo será mayor y los espacios entre las partículas del soporte estarán llenos de agua, limitándose así la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa en el sistema y los nutrientes solubles estarán diluidos debido a la cantidad de agua presente en el sistema. La poca disponibilidad del oxígeno en el sistema puede favorecer el metabolismo anaerobio, y derivar en problemas de contaminación por bacterias o levaduras (Pandey, 2003).

En la figura 23 A y B se presenta la cantidad de humedad presente en el sistema al finalizar el tiempo de cultivo, en función de la distancia entre electrodos y para ambos ensayos a voltaje/corriente variable y voltaje constante. En ella se observa que tanto en ausencia de un potencial eléctrico como en presencia de él, el contenido de humedad es igual, con un valor del 55 %, valor que corresponde a 2.5 veces la humedad crítica del soporte (1.53 g H₂O/gss), por lo que al realizar un análisis de varianza para el contenido de humedad en función de la distancia entre los electrodos del sistema y de los potenciales eléctricos aplicados, no se encontraron diferencias significativas (α 0.05) (Anexo 10).

Este contenido de humedad (50 %), se encuentra dentro del intervalos definidos en diversos estudios para la producción de enzimas como la invertasa, utilizando como soporte de fermentación, soportes inertes (Gerardo-Mendoza, 2003; Nuñez, 2004).

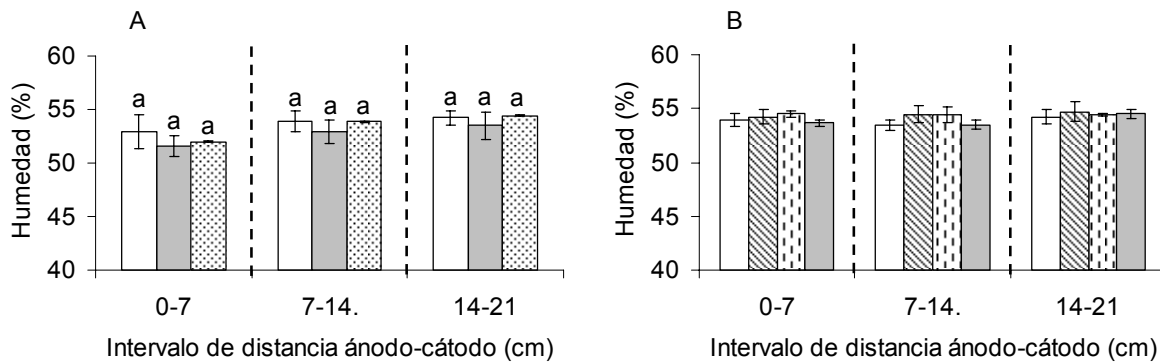


Figura 23. Contenido de humedad (%) al final del cultivo (35 h) en función del potencial eléctrico aplicado; A) voltaje-corriente variable y B) voltaje constante, □ 0V, ▨ 2.5V, ▩ 5.5V, ■ 10.5V, ▩ 15.5V. Los valores con diferente notación (a, b, c) presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) (ensayos realizados por triplicado).

Por otro lado, también corresponde a lo descrito por Oriol *et al.*, 1988; en el que define al contenido de humedad como un factor limitante para el crecimiento de los microorganismos y para la producción de enzimas en FMS, ya que de ella depende la capacidad de retención de agua (Pandey *et al.*, 1994), que de manera general se encuentra en un intervalo de 20 a 80 %, dependiendo del soporte utilizado (Oriol y *et al.*, 1988).

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

La aplicación permanente de un potencial eléctrico, tanto a voltaje-corriente variable, como a voltaje constante en cultivos en fase sólida de *A. niger*, permitió la evaluación del metabolismo de un sustrato como única fuente de carbono, a partir del comportamiento de variables relevantes en el crecimiento microbiano, como son: la fase de germinación (*lag*) y la tasa específica de crecimiento (μ), así como también la evaluación de la producción de una enzima con actividad extracelular (invertasa), que está asociada al crecimiento de *A. niger*.

A. niger fue capaz de producir extracelularmente la actividad de la invertasa (β -D-fructofuranosidasa), al someterla a un cultivo con sacarosa como única fuente de carbono, en presencia de potenciales eléctricos de diversas magnitudes y con diferentes contenidos de humedad 45-60 %.

Al aplicar un potencial eléctrico tanto a voltaje-corriente variable (intervalo de potencial de 10.5-15.5 V), como a voltaje constante (intervalo de potencial de 2.5-10.5 V), la velocidad de producción de CO₂ disminuye ligeramente al incrementar el potencial eléctrico en dichos intervalos. Así como también no se estimula la fase *lag*, ni la tasa específica de crecimiento (μ) de *A. niger*. No se favorece la producción de invertasa, ya que ésta disminuye al incrementar el potencial eléctrico en dichos intervalos; sin embargo, se favorece la hidrólisis de sacarosa en un 100 %. Por otro lado, las variables fisicoquímicas importantes involucradas en el crecimiento de *A. niger*, tampoco se ven afectadas por la aplicación de potenciales eléctricos de dichas magnitudes.

La aplicación de potenciales eléctricos no modifica la producción de la enzima invertasa, pero si su actividad catalítica, lo que conduce a un mayor grado de hidrólisis de sacarosa y a la acumulación de azúcares reductores, bajo las condiciones de estudio.

Perspectivas

En este trabajo se presentaron los resultados del efecto del potencial eléctrico de baja magnitud en dos condiciones diferentes (voltaje-corriente variable y voltaje constante) sobre el metabolismo de un hongo filamentoso de importancia biotecnológica como *A. niger* en fermentación en medio sólido. Dada la importancia industrial de *A. niger*, se han buscado nuevas alternativas para maximizar sus capacidades fisiológicas, una de ellas, es la producción de enzimas. Entre ellas, encontramos a la invertasa, enzima que hidroliza la sacarosa produciendo una mezcla de fructosa y glucosa 1:1, esta mezcla conocida como azúcar invertida, tiene mayor poder edulcorante que la sacarosa y es usada ampliamente en la industria alimenticia, por lo que ha ganado tremenda importancia comercial debido a sus propiedades. La invertasa está catalogada dentro de las enzimas solubles de alta demanda (Huerta-Ochoa, 2004), por lo que se han usado diferentes métodos para tratar de obtener la mayor producción de esta enzima a partir de los microorganismos que comercialmente la producen.

Entre estos métodos, se propone la aplicación de potenciales eléctricos de baja magnitud, ya que en trabajos anteriores realizados por nuestro grupo de trabajo, se observó que con ello se incrementa el crecimiento de *A. niger*, mientras que el de alta magnitud provocó la reducción del mismo. En este trabajo, la aplicación de potenciales eléctricos produjo efectos positivos sobre la actividad catalítica de la invertasa, aumentando considerablemente la hidrólisis de la sacarosa en 35 h de cultivo.

Dados los resultados obtenidos y la importancia de la invertasa, este método es prometedor, en cuanto a la actividad catalítica de la misma. A partir de la aplicación de potenciales eléctricos, se podría maximizar tanto la producción de la invertasa como su actividad catalítica sobre la sacarosa. Para ello, se requiere de la caracterización analítica de las concentraciones de sacarosa durante todo el cultivo y de un sistema a base de celdas electroquímicas que permita el análisis de proceso.

Este método también puede ser adecuado para la extracción de invertasa intracelular de *A. niger*, modificando la función de la membrana celular, lo que tendrá algunas ventajas, ya que facilitará la eficiencia de recuperación y el proceso de purificación de la enzima. Sin embargo, podría existir una inactivación parcial de la enzima, debida a la generación de calor o al prolongado tiempo de incubación.

CAPÍTULO 9

LITERATURA CITADA

9. LITERATURA CITADA

- Alberts, B., Alexander, J., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. Molecular Biology of the cell. 4^{ta} edition. Garland Science, New York.
- Atlas, Ronald M. 1989. Microbiology: Fundamentals and applications. 2^a ed. Ed. Macmillan Publishing Company. New York, USA. 807p.
- Belcarz, A., Ginalska, G., Lobarzewskai, J., Penel, C. 2002. The novel non-glycosylated invertasa from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1594: 40-53.
- Bennett, J. W. and Klich, M. A. (Eds). 1992. Biotechnology and Industrial Applications (Parte II) En: *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*. Ed. Butterworth-Heinemann, USA. pp 91-195.
- Boddy L. M., Bergès T., Barreau C., Vainstein M. H., Dobson M. J., Ballance D. J., Peberdy J. F. 1993. Purification and characterization of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence. *Current Genetic*, 24: 60-66.
- Costaglioli, P., Meilhoc, E., Janatova, I., Klein, R., Masson, M. 1997. Secretion of invertasa from *Schwanniomyces occidentales*. *Biotechnology Letters*, 19: 623-627.
- Dogan, M., Alkan, M., Cakir, U. 1997. Electrokinetic Proprieties of Perlite. *Journal of colloid and interface science*, 192: 114-118.

-
- Evans, D. H., O'Connell, K.M., Peterson, R. A., Kelly, M.J. 1983. "Cyclic Voltammetry". *Journal of Chemical Education*, 60 (4): 290-292.
 - Fiedurek, J., Pielecki, J., Skowronek, M. 2000. Direct methods for selecting mutants with increased production of invertasa from mutagenised cultures of *Aspergillus fumigatus*. *Journal Basic of Microbiology*, 40: 111-118.
 - García-Sancho, J., Montero, M., Álvarez, J., Fonteriz, R. I., Sánchez, A. 1994. Effects of extremely-low-frequency electromagnetic fields on ion transport in several mammalian cell. *Bioelectromagnetics*, 15: 579-588.
 - Gerardo-Mendoza, I. 2003. Efecto de la concentración de sacarosa y humedad sobre el metabolismo de *A. niger* en fermentación en medio sólido en un soporte sólido (agrolita). Reporte de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F. 41p.
 - Gervais, P., Molin, P., Grajek, W., Bensoussan, M. 1988. Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnology and Bioengineering*, 31: 457-463.
 - Gervais, P., Marechal, P. A., Mollin, P. 1996. Water relations of solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 55: 347-357.
 - Gervais, P. and Molin, P. 2003. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 85-101.
 - Gracida-Rodríguez, J., Favela-Torres, E., Prado-Barragán, A., Huerta-Ochoa, S., Saucedo-Castañeda, G. 2004. Invertases. *Enzyme Technology*, 23: 441-451.
 - Huerta-Ochoa, S. 2004. Reactores enzimáticos, 1ª edición. Ed. UAM. México, D.F. pp 13.
 - James, J. and Simpson, B. K. 1996. Application of enzymes in food processing. *CRC Critical Review in Food Science Nutrition*, 36: 437-463.

- Kissinger, P. T. and Heineman, R. W. 1983. "Cyclic Voltammetry", *Journal of Chemical Education*, 60 (9): 702-706.
- Kristupaitis, D., Dibirdik, I., Vassilev, A., Majan, S., Kusosaki, T., Chu, A., Tuel- Ahigren, L., Tuong, D., Luben, R., Uckum, F. M. 1998. Electromagnetic field-induced stimulation of Bruton's tyrosine kinase. *Journal Biological Chemistry*, 273: 12397-12401.
- Lacy-Hulbert, A., Metcalfe, J. C., Hesketh, R. 1998. Biological responses to electromagnetic fields. *FACEB Journal*, 12: 395-420.
- Lindstrom, E., Lindstrom, P., Berglund, A., Mild K, H., Lundgren, E. 1993. Intracellular calcium oscillations in a T-cell line by a weak 50 Hz magnetic field. *Journal Cellular Physiological*, 156: 395-398.
- Lindstrom, E., Lindstrom, P., Berglund, A., Lundgren, E., Mild K, H. 1995. Intracellular calcium oscillations in a T-cell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic field with variable frequencies and flux densities. *Bioelectromagnetics*, 16: 41-47.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2003. *Biología Celular y Molecular*. 4^{ta} edición. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España. 1084p.
- Lu, W., Li, D., Wu, Y. 2003. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphurous*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 305-311.
- Mabbott G. A. 1983. An Introduction to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 60 (9):697-776.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 2004. Brock: *Biología de los microorganismos*. 10^a ed. Ed. Pearson Prentice Hall. Madrid, España. 1011p.

- Martínez R., M. A., Alba F. J., Garza G. D. 1998. Micosis más frecuentes en México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I. P. N. México D.F. 137p.
- Mendoza, I., Oropeza, T., Favela, E. 2003. Evaluación del efecto electroquímico sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido. X-Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco.
- Miller L. G. 1960. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3): 426-428.
- Mitchel, D. A., Berovic, M., Krieger, N. 2000. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 68: 61-138.
- Moore-Landecker, E. 1996. Fundamentals of the Fungi. 4^a ed. Ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. 574p.
- Mukherjee, S., Basak, S., Khowala, S. 2002. Regulation of activity and coinformation of sucrase by coaggregation with cellobiose in culture of medium of *Termitomyces clypeatus*. *Biotechnology Progress*, 18: 404-408.
- Nuñez-Gaona, O. 2004. Producción de Invertasa por *Aspergillus niger* en Fermentación en Medio Sólido. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. México D.F. 68 p.
- Onions, A. H., Allsopp, D., Eggins, H. O. 1981. Smith's Introduction to Industrial Mycology. 7a ed. Ed. John Wiley & Sons. New York, USA. 395p.
- Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S., Viniestra-González, G. 1988. Water and water activity in solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27: 498-503.

- Oropeza-Guzmán, M. T., Ponce de León-Albarrán, C., González-Martínez, I. 2000. Principios y aplicaciones de los procesos electroquímicos. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. México D.F. p. 223.
- Ooijkaas, L. P., Weber, F. J., Buitelaar, R. M., Tramper, J., Rinzema, A. 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Elsevier Science*, 18: 356-360.
- Oostra, J., Comte, E. P., Heuvel, J. C., Tramper, J., Rinzema, A. 2001. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 74: 13-24.
- Pamukcu, S. and Wittle, J. K. 1992. Electrokinetic removal of selected heavy metals from soil. *Environment Progress*, 11 (3): 241-250.
- Panagopoulos, D. J., Messini, N., Karabarbounis, A., Philippetis, A. L., Margaritis, L. H. 2000. A mechanism for action of oscillating electric fields on cell. *Biochemical and Biophysical Resource Comment*, 272: 634-640.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81-84.
- Pandey, A., Ashakumary, L., Selvakumar, P., Vijayalakshmi, K. S. 1994. Influence of water activity on growth and activity of *Aspergillus niger* for glycoamylase production in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10: 485-486.
- Peberdy, J. F. 1993. Protein secretion in *Aspergillus*: invertase as a model system. *Journal Chemistry Technology and Biotechnology, B-Biotechnology*, 56: 216-217.
- Persike, D., Bonfim, T., Santos, M., Lyng, S., Chiarello, M., Fontana, J. 2002. Invertase and urease activities in the carotenogenic yeast

Xanthophyllomyces dendrorthus (formely *Phaffia rhodozyma*). *Bioresource Technology*, 82: 79-85.

- Portier, C. J. and Wolfe, M. S. 1998. Assessment of health effects from exposure to power-line frequency electric and fields magnetic. Working group report. Departament de Energy, USA.
- Probst, R. F. Jacobs, R. A., Sengun, M. Z., Hicks, E. R. 1994. Model and experiments on soil, remediation by electric fields. *Journal Environmental Science Health*, A29 (9): 1933-1955.
- Raimbault, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 1 (3): 3-15.
- Raper, K. B. and Fennell, D. I. 1965. The genus *Aspergillus*. Ed. The Williams & Wilkins Company. Baltimore, USA. 344p.
- Santana, A. and Costa, L. 2005. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into inact cell of *Cladosporium cladosporioides*. *Journal Biotechnology*, 8: 54-62.
- Saucedo- Castañeda, G., Trejo-Hernández, M. R. 1994. On-line Automated Monitoring and Control Systems for CO₂ in Aerobic and Anaerobic Solid-State Fermentations. *Process Biochemistry*, 29 (1994): 13-24.
- Solís-Pereira, S., Favela-Torres, E., Gutierrez-Rojas, M., Roussos, S., Saucedo-Castañeda, G., Gunasekaran, P., Viniegra-González, G. 1996. Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentations at high initial glucose concentrations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 257-260.
- Strasák, L., Vetterl, V., Smarda, J. 2002. Effects of low- frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. *Bioelectrochemical*, 55: 161-164.

- Teissié, J., Eynard, N., Vernhes, M. C., Bénichou, A., Ganeva, V., Galutzov, B., Cabanes, P. A. 2002. Recent biotechnological developments of electropulsation: A prospective review. *Bioelectrochemical*, 55: 107-112.
- Tenforde, T. S. 1991. Biological interactions of extremely-frequency electric and magnetic fields. *Bioelectrochemistry and Bioengineering*, 25:1-17.
- Uckun, F. M., Kurosaki, T., Jin, J., Jun, X., Morgan, A., Takata, M. 1995. Exposure of B-lineage lymphoid cell to low energy electromagnetic fields stimulates Lyn kinase. *Journal Biology Chemistry*, 270: 27666-27670.
- Vainstein, M. H. and Peberdy, J. F. 1991. Regulation of invertase in *Aspergillus nidulans*: effect of different carbon sources. *Journal Genetic Microbiology*, 137: 315-321.
- Van Cauwenberghe, L. 1997. Electrokinetics. Technology Evaluation Reports TO-97-03. GWRTAC E Series. USA.
- Vargas, L., Piao, A., Domingos, R., Carmona, E. 2004. Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 137-142.
- Workman, W., and Day, D. 1983. Purification and properties of the beta-fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *FEBS Letters*, 160: 16-20.

ANEXOS

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

a) Análisis de varianza para los ensayos con diferente contenido de humedad inicial.

Anexo 1. Análisis de varianza para la producción de invertasa por *Aspergillus niger*, en función del contenido de humedad inicial y de la distancia ánodo-cátodo.

cm	60% Hum ± DS	55% Hum ± DS	45% Hum ± DS
0-7	16.30 ± 2.26 ^a	11.38 ± 4.50 ^b	11.85 ± 1.62 ^b
7-14	12.7 ± 2.40 ^a	9.24 ± 4.42 ^b	9.0 ± 2.00 ^b
14-21	14.6 ± 2.20 ^a	10.62 ± 5.26 ^b	9.4 ± 2.42 ^b

a, b, c Los valores con diferente subíndice presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).

Anexo 2. Análisis de varianza para el pH, en función del contenido de humedad inicial 45 y de la distancia ánodo-cátodo.

cm	60% Hum ± DS	55% Hum ± DS	45% Hum ± DS
0-7	6.97 ± 0.35 ^a	7.26 ± 0.07 ^a	7.14 ± 0.37 ^a
7-14	7.38 ± 0.41 ^a	7.26 ± 0.08 ^a	7.13 ± 0.34 ^a
14-21	7.52 ± 0.57 ^a	7.24 ± 0.04 ^a	7.12 ± 0.34 ^a

a, b, c Los valores con diferente subíndice presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).

Anexo 3. Análisis de varianza para la conductividad eléctrica, en función del contenido de humedad inicial y de la distancia ánodo-cátodo.

cm	60% Hum ± DS	55% Hum ± DS	45% Hum ± DS
cm	-	1.77 ± 0.16 ^a	2.47 ± 0.20 ^b
7	-	1.76 ± 0.13 ^a	2.36 ± 0.36 ^b
14	-	1.75 ± 0.2 ^a	2.36 ± 0.37 ^b

a, b, c Los valores con diferente subíndice presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).

Anexo 4. Análisis de varianza para la actividad de agua, en función del contenido de humedad inicial y de la distancia ánodo-cátodo.

cm	60% Hum ± DS	55% Hum ± DS	45% Hum ± DS
0-7	0.990 ± 0.00 ^a	0.985 ± 0.00 ^a	0.983 ± 0.00 ^a
7-14	0.990 ± 0.00 ^a	0.985 ± 0.00 ^a	0.985 ± 0.00 ^a
14-21	0.992 ± 0.00 ^a	0.984 ± 0.00 ^a	0.985 ± 0.00 ^a

a, b, c Los valores con diferente subíndice presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).

Anexo 5. Análisis de varianza para el contenido de humedad, en función del contenido de humedad inicial y de la distancia ánodo-cátodo.

cm	60% Hum ± DS	55% Hum ± DS	45% Hum ± DS
0-7	56.63 ± 1.47 ^a	52.94 ± 2.02 ^b	45.82 ± 0.50 ^c
7-14	57.08 ± 1.12 ^a	54.0 ± 1.17 ^b	45.66 ± 0.30 ^c
14-21	57.35 ± 1.27 ^a	54.20 ± 0.67 ^b	46.10 ± 0.31 ^c

a, b, c Los valores con diferente subíndice presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).

b) Análisis de varianza para los ensayos a voltaje-corriente variable

Anexo 6. Análisis de varianza para la producción de invertasa por *Aspergillus niger*, en función del potencial eléctrico (voltaje/corriente variable) y de la distancia ánodo-cátodo.

cm	0V ± DS	10.5V ± DS	15.5 ± DS
0-7	11.37 ± 4.49 ^a	6.19 ± 2.19 ^b	2.13 ± 0.70 ^c
7-14	9.23 ± 4.41 ^a	8.86 ± 2.04 ^a	6.33 ± 0.15 ^b
14-21	10.62 ± 5.26 ^a	11.68 ± 2.37 ^a	10.63 ± 1.33 ^a

a, b, c Los valores con diferente subíndice presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).

Anexo 7. Análisis de varianza para el pH, en función del potencial eléctrico (voltaje/corriente variable) y de la distancia ánodo-cátodo.

cm	0V ± DS	10.5V ± DS	15.5 ± DS
0-7	7.25 ± 0.06 ^a	4.89 ± 0.07 ^b	3.96 ± 0.08 ^c
7-14	7.26 ± 0.06 ^b	7.04 ± 0.08 ^a	6.97 ± 0.03 ^a
14-21	7.24 ± 0.03 ^a	7.73 ± 0.02 ^b	8.11 ± 0.09 ^c

a, b, c Los valores con diferente subíndice presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).

Anexo 8. Análisis de varianza para la conductividad eléctrica, en función del potencial eléctrico (voltaje/corriente variable) y de la distancia ánodo-cátodo.

cm	0V ± DS	10.5V ± DS	15.5 ± DS
0-7	1.76 ± 0.12 ^a	1.49 ± 0.11 ^a	1.55 ± 0.05 ^a
7-14	1.75 ± 0.13 ^a	1.80 ± 0.18 ^a	1.76 ± 0.04 ^a
14-21	1.74 ± 0.17 ^a	1.80 ± 0.25 ^a	1.82 ± 0.04 ^a

a, b, c Los valores con diferente subíndice presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).

Anexo 9. Análisis de varianza para la actividad de agua, en función del potencial eléctrico (voltaje/corriente variable) y de la distancia ánodo-cátodo.

cm	0V ± DS	10.5V ± DS	15.5 ± DS
0-7	0.985 ± 0.002 ^a	0.991 ± 0.001 ^a	0.990 ± 0.001 ^a
7-14	0.985 ± 0.002 ^a	0.990 ± 0.000 ^a	0.990 ± 0.002 ^a
14-21	0.984 ± 0.003 ^a	0.990 ± 0.002 ^{0a}	0.990 ± 0.002 ^a

a, b, c Los valores con diferente subíndice presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).

Anexo 10. Análisis de varianza para el contenido de humedad, en función del potencial eléctrico (voltaje/corriente variable) y de la distancia ánodo-cátodo.

cm	0V ± DS	10.5V ± DS	15.5 ± DS
0-7	52.9 ± 1.58 ^a	51.6 ± 0.97 ^a	51.9 ± 0.27 ^a
7-14	53.9 ± 1.01 ^a	53.8 ± 1.0 ^a	53.9 ± 0.69 ^a
14-21	54.2 ± 0.69 ^a	53.5 ± 1.24 ^a	54.4 ± 0.52 ^a

a, b, c Los valores con diferente subíndice presentan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).

NOTA: Todos los análisis de varianza se realizaron por cada grupo de fracción del reactor (7, 14 y 21cm), tanto en la caracterización de la FMS (efecto de la humedad), como en del potencial eléctrico aplicado.

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada”:

“Evaluación del efecto electroquímico sobre el metabolismo de *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido”

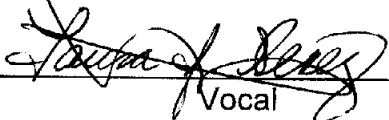
JURADO DE EXÁMEN



Presidente

Dr. Ignacio González Martínez


Departamento de Electroquímica
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal

Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Secretario

Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldivar

Facultad de Química
Departamento de Química Inorgánica
Universidad Nacional Autónoma de México
