

**UNIVERSIDAD**

**AUTONOMA**

**METROPOLITANA**

IZTAPALAPA

CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

**T E S I S**

PRESENTADA EN LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

**EFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA EN EL  
CRECIMIENTO Y LA PRODUCCION DE ACIDO CITRICO EN  
*Aspergillus niger* POR FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO**

POR

**JESUS ANTONIO CORDOVA LOPEZ**

ING. BIOQUÍMICO INDUSTRIAL

PRESENTADA EL 19 DE SEPTIEMBRE DE 1994 ANTE EL JURADO  
COMPUESTO POR:

FAVELA TORRES ERNESTO

GUTIERREZ ROJAS MARIANO

AGUILAR OSORIO JOSE GUILLERMO DE JESUS

GALINDO FENTANES ENRIQUE

PRESIDENTE

SECRETARIO

VOCAL

VOCAL

## RESUMEN

Los estudios cinéticos de *Aspergillus niger* por Fermentación en Estado Sólido (FES) requieren el empleo de soportes modelo impregnados con medios de cultivo definidos para evitar la complejidad estructural y nutritiva del sustrato sólido. El soporte empleado en este trabajo fue la amberlita IRA-900, una resina de intercambio aniónico a la que se le aplicó una solución de sulfatos y fosfatos para minimizar su capacidad intercambiadora, de tal manera que cuando se adicionó un medio de cultivo no adsorbió aniones esenciales para el metabolismo fúngico. La necesidad de este tratamiento se justificó al comparar el comportamiento que *A. niger* mostró en una FES con resina no tratada y tratada. En el caso de una resina sin tratamiento, el consumo de glucosa es limitado por la disponibilidad de aniones en solución y el pH al que inicia la fermentación es muy alto (6.8) e inadecuado para el crecimiento. Por el contrario, en una FES con resina tratada, el consumo de glucosa procede rápidamente y el pH al que inicia el cultivo (4.5) es apropiado.

Al aumentar la concentración inicial de glucosa de 50 a 400 g/l, las fases de adaptación de *A. niger* no fueron afectadas y las velocidades específicas de crecimiento disminuyeron ligeramente de 0.35 a 0.2 h<sup>-1</sup>. Los parámetros de esta inhibición por sustrato fueron:  $K_i$  de 259 g de glucosa/l y  $\mu_{max}$  de 0.4 h<sup>-1</sup>. Conforme la concentración de glucosa aumentó, el rendimiento en la formación de biomasa por glucosa consumida ( $Y_{x/s}$ ) disminuyó progresivamente desde 0.73 a 0.13, usando este comportamiento como una medida del desacoplamiento metabólico.

Como consecuencia en el aumento de la concentración inicial de glucosa (disminución en la actividad de agua ( $A_w$ ) de 0.954 a 0.907), *Aspergillus niger* sintetizó eritrol y glicerol. Estos polioles fueron identificados como osmorreguladores en FES, de los cuales el principal osmorregulador fue el eritrol. Por su parte, el glicerol sólo se produjo a las concentraciones iniciales de glucosa de 300 y 400 g/l, lo que sugirió que es el osmorregulador empleado en condiciones osmóticas extremas ( $A_w < 0.92$ ). Además, el glicerol actuó como regulador en la acumulación de ácido cítrico con características similares a las presentadas en cultivo líquido, encontrando que cuando la biosíntesis de glicerol ocurre, la producción de ácido cítrico se detiene y viceversa; resultando evidente la influencia que ejerce el uno sobre la síntesis del otro.

A 300 g/l de glucosa, se obtuvo un máximo en esporulación de  $1.4 \cdot 10^9$  esporas/g resina seca, que podría relacionarse con la elevada producción y productividad de ácido cítrico (85 g/l, 1.21 g/(l·h)) superiores a las reportadas en cultivo líquido. Este sistema de FES se propone para la producción de ácido cítrico, realizando algunas modificaciones en el medio de cultivo.

**Palabras clave:** *Aspergillus niger*, metabolismo, fermentación en estado sólido, soporte modelo, resina de intercambio iónico, parámetros cinéticos, osmorregulación, solutos compatibles y ácido cítrico.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, que desde hace buen tiempo perdió la noción de mis actividades escolares, pero que sin embargo, aún en la distancia, siempre percibí su apoyo incondicional.

A mis asesores que contribuyeron determinadamente en mi formación como investigador: Dr. Ernesto Favela, quien durante el desarrollo experimental de este trabajo, estuvo siempre en la mejor disponibilidad de atender y entender mis necesidades. M. C. Mariano Gutiérrez, quien con sus atinados comentarios, siempre objetivos, tuvo la virtud de orientar y corregir el rumbo de la investigación.

A mis compañeros de la primera generación de la maestría en Biotecnología, por sus muestras de afecto y unidad, especialmente a Octavio.

Al Dr. Gerardo Saucedo, por sus comentarios antes y durante la redacción de la presente tesis, particularmente por el ánimo transmitido en momentos de agotamiento.

A Agustín Torres por revisarme con tanta paciencia la redacción de la tesis y por estar conmigo justo en los momentos más difíciles e influirme positivamente.

A mis compañeros de laboratorio (Planta Piloto de Fermentaciones), por su comprensión y aliento, especialmente a Mayola y Tania.

Al Dr. Enrique Galindo por el interés mostrado durante su ardua labor en la corrección final de la tesis.

A CONACYT, por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

A Rohm and Haas, por abastecernos de la resina de intercambio iónico.

3.4 Técnicas de conservación	23
3.4.1 Congelación	23
3.4.2 Liofilización	23
3.5 Producción del inóculo	24
3.5.1 Estimulación de la esporulación	24
3.5.2 Propagación	24
3.5.3 Cosecha de esporas	24
3.5.4 Conteo de esporas	25
3.5.5 Inoculación en cultivo superficial	25
3.5.6 Cultivo superficial para observar el efecto del tratamiento de la resina en el hongo.	25
3.6 Montaje de las FES	26
3.6.1 Columnas	26
3.6.2 Condiciones de cultivo	26
3.6.3 Inoculación	26
3.7 Técnicas analíticas	26
3.7.1 Análisis de glucosa, peso seco y ácido cítrico en cultivo superficial	26
3.7.2 Muestreo de las columnas	27
3.7.3 Análisis fisicoquímicos	28
3.7.4 Análisis de glucosa en FES	28
3.7.5 Análisis de aniones	28
3.7.6 Análisis de ácidos orgánicos	29
3.7.7 Análisis de polioles	30
3.8 Tratamiento del soporte	30
3.8.1 Tratamiento con fosfatos	30
3.8.2 Tratamiento propuesto	30
3.9 Estimación de la biomasa en un sistema de FES	31
3.9.1 Procedimiento	31
3.9.2 Curvas estándares	32
3.9.3 Preparación del reactivo Azul de Coomassie	32

## **ESTUDIO DEL INTERCAMBIO IONICO DE LA AMBERLITA IRA-900**

33

4.1 Tratamiento de la Amberlita IRA-900	37
4.1.1 Tratamiento con fosfatos	37
4.1.2 Propuesta de un tratamiento para la resina	38
4.2 Efecto del tratamiento del soporte en el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i>	39
4.2.1 Influencia indirecta del tratamiento del soporte en el crecimiento y consumo de sustrato de <i>A. niger</i> por cultivo superficial	39
4.2.2 Importancia del tratamiento de la resina en el consumo de sustrato por FES	41
4.2.3 Crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> a diferentes concentraciones de glucosa	43
4.3 Conclusiones.	45

## **5 PARAMETROS CINETICOS Y BALANCES DE MATERIA Y ENERGIA**

5.1 Parámetros cinéticos	47
5.1.1 Etapas de crecimiento	47
5.1.2 Velocidad específica de crecimiento	53
5.1.3 Velocidad específica de consumo de sustrato	55
5.1.4 Velocidades específicas de formación de producto	56
5.1.5 Rendimientos	58
5.2 Balances de materia y energía	60
5.3 Conclusiones	64
5.4 Perspectivas de aplicación.	65

## **6 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA EN LA PRODUCCION DE ACIDO CITRICO EN *A. niger***

6.1 Osmorregulación	68
6.1.1 Eritrol	68
6.1.2 Glicerol	69

6.2 Papel del glicerol en la acumulación de ácido cítrico	71
6.3 Conclusiones	75
<b>7 CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>75</b>
<b>8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO</b>	<b>85</b>
<b>Anexo A : Tratamiento de la resina</b>	<b>86</b>
A.1 Influencia sobre la retención de proteína del tiempo de exposición y de la concentración de fosfatos en el tratamiento de la resina	86
A.2 Sorción isotérmica de proteína en función de la concentración de fosfatos.	87
A.3 Retención de biomasa, glucosa y urea en la resina	87
A.4 Análisis preliminar de la interacción con aniones de una resina tratada con fosfatos, con nitratos o sulfatos.	88
A.5 Efecto de la temperatura y de la concentración de sulfatos en el tratamiento de la resina, teniendo como variable de respuesta la adsorción de fosfatos	89
A.6 Tratamiento con citrato	90
A.7 Tratamiento con citrato y sulfato	91
A.8 Desorción de cloruros en la resina con iones hidróxido y sulfato	92
<b>Anexo B : Estimación de la biomasa</b>	<b>93</b>
B.1 Condiciones de concentración de ácido fosfórico y tiempo de reacción en la hidrólisis de micelio de <i>Aspergillus nige</i>	93
B.2 Interferencias del sistema de fermentación con el método del colorante ligado a la proteína y comparación entre la hidrólisis ácida y la hidrólisis alcalina.	94
B.3 Efecto de la concentración inicial de glucosa en la composición de la biomasa y su respuesta con el método del colorante ligado a la proteína.	96

# **INTRODUCCION**

## 1 INTRODUCCION

Las fermentaciones en estado sólido (FES) han sido empleadas desde la antigüedad en el composteo, ensilado y alimentos fermentados (Aidoo y col., 1982). Sin embargo, con el descubrimiento de la penicilina y el desarrollo de su proceso de obtención en fermentación sumergida (FSm), la FES fue remplazada por la FSm. La preferencia de trabajar con las FSm se debe a la facilidad en el control del proceso y en los procedimientos analíticos; de esta forma, la potencialidad de la FES no se han desarrollado con la misma intensidad.

Recientemente han aparecido numerosas publicaciones (revisadas por Mudgett, 1986 y Pandey, 1992), donde puede constatarse el nuevo interés que la FES despierta en la comunidad científica, pudiendo comprobarse en algunas de ellas, los elevados rendimientos, producciones y productividades (comparados con la FSm) de productos comercialmente atractivos (Soccol, 1992; Solis y col., 1993).

La dificultad para realizar estudios básicos en FES se debe a la heterogeneidad del sistema y a la complejidad estructural y nutricional de los sustratos sólidos (Knapp y Howell, 1980). Estas son las causas por las que se recurren al empleo de soportes modelo, los cuales se impregnan con medios de cultivo químicamente definidos, permitiendo además realizarse comparaciones más cercanas con las FSm (donde se acumula la mayor parte de la información científica) y mostrar las ventajas que pudiera tener en algunos procesos sobre la FSm.

Cabe señalar que otro de los problemas principales a los que se enfrenta la FES, se refiere a la cuantificación de biomasa. Cuando los hongos y levaduras crecen sobre un sustrato sólido, son capaces de secretar polisacáridos que les aseguran su adhesión (Corpe, 1980), de tal manera que se establece un vínculo íntimo entre el sólido y el microorganismo, siendo difícil su separación, y por consiguiente su cuantificación.

El microorganismo seleccionado para estos estudios fue *Aspergillus niger* por ser ampliamente utilizado en FES (en la producción de ácidos orgánicos (Lockwood, 1973), enzimas y proteína (Pandey, 1992)). A pesar de sus numerosas aplicaciones, son pocos los estudios cinéticos reportados que brinden información descriptiva del proceso que puedan ser aplicados a su control y optimización (Raimbault y Alazard, 1980; Oriol y col., 1988). En este contexto, el presente trabajo ofrece una contribución.

El soporte modelo que se empleó en este trabajo es la Amberlita IRA-900 (Auria y col., 1990). Sin embargo, por ser una resina de intercambio aniónico, fue necesario someterla a un tratamiento a base de contraiones para minimizar su capacidad

intercambiadora y evitar la adsorción de aniones del medio de cultivo.

El interés de estudiar concentraciones elevadas de glucosa radica en aprovechar la virtud de la FES y en obtener productos más concentrados. Sin embargo, cuando *Aspergillus niger* crece en medios con elevada concentración de solutos, se somete a un estrés osmótico y como respuesta biosintetiza osmorreguladores (Blomberg y Adler, 1992) que a pesar de causar las mínimas inhibiciones enzimáticas (Brown, 1978), son capaces de desviar el metabolismo (Legiša y Matthey, 1986a, 1986b, 1988; Legiša y Kidric, 1989). En este trabajo, se estudiaron algunos aspectos en la regulación metabólica del hongo, relacionados con la osmorregulación y su vinculación con la producción de ácido cítrico.

El objetivo general de la presente tesis fue estudiar el efecto de la concentración de glucosa en el crecimiento y la producción de ácido cítrico en *Aspergillus niger* por FES.

La hipótesis en que se fundamentó el presente trabajo consistió en que cuando un cultivo crece a concentraciones bajas de glucosa, la mayor parte del consumo del azúcar se dirige para la formación de biomasa; mientras que a concentraciones elevadas, el principal consumo se orienta hacia la formación de otros productos distintos a la biomasa.

La primera parte de este trabajo consistió en la propuesta de un tratamiento aplicado a la resina para minimizar su capacidad de intercambio iónico; posteriormente, se evaluó y se justificó la necesidad del tratamiento, por la influencia que ejerció sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*.

En la segunda parte se realizaron fermentaciones en estado sólido, empleando como soporte a la Amberlita IRA-900. Se estudió el efecto de la concentración de glucosa en el crecimiento de *Aspergillus niger* con un medio de cultivo limitado en nitrógeno y se analizó la biosíntesis de osmorreguladores y su posible vinculación con la producción de ácido cítrico como respuesta ante el incremento de la concentración de glucosa.

## **REVISION BIBLIOGRAFICA**

## **2 REVISION BIBLIOGRAFICA**

La revisión bibliográfica está dividida en cuatro subcapítulos, en los que se presenta un panorama global de los aspectos teóricos relacionados con los procesos de fermentación en estado sólido (FES). La primera parte está enfocada a los conceptos generales de la FES. En segundo término se aborda el tema de soportes para FES, haciendo hincapié en los soportes modelo como herramientas en el estudio básico del metabolismo. El tercer punto trata sobre el tipo de crecimiento de los hongos. Finalmente, se tratan las rutas metabólicas, haciendo énfasis en los puntos claves de regulación para la producción de polioles y ácido cítrico como respuesta ante un potencial osmótico reducido.

### **2.1 FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO.**

#### **2.1.1 Definición.**

La fermentación en estado sólido (FES) puede definirse como aquella en la que los microorganismos crecen sobre la superficie de un sustrato sólido (Pandey, 1992). El sustrato contiene agua que se encuentra retenida en su matriz porosa que permite que las funciones vitales del microorganismo se realicen. La humedad del sólido depende de su capacidad de retención de líquido y no puede excederse de un límite máximo sin que ésta drene.

Antiguamente, la FES era empleada principalmente en países orientales para la elaboración de alimentos fermentados, en la maduración de quesos, en el ensilaje y en el composteo (Moo-Young y col., 1983). Con el advenimiento de la segunda guerra mundial, se encontró al cultivo sumergido como una atractiva alternativa para la producción de antibióticos por la facilidad en el control del proceso. Desde entonces, la mayor parte de los estudios básicos han sido enfocados hacia el cultivo sumergido. Recientemente la FES ha vuelto a tomar auge, en el tratamiento de residuos sólidos, en la producción ácidos orgánicos (Moo-Young y col., 1983), enzimas (Mudgett, 1986; Pandey, 1992) proteína y probióticos para la alimentación animal (Moo-Young y col., 1992).

### 2.1.2 Ventajas y desventajas

Las ventajas y desventajas atribuidas a la FES en relación al cultivo sumergido, citadas por Hesseltine (1972), Mudgett (1986) y Shankaranand y col. (1992) se enlistan a continuación:

#### VENTAJAS:

- i) No se requieren condiciones estrictas de esterilidad, ya que la baja humedad de los sustratos sólidos reduce el problema de contaminación.
- ii) Se obtienen productos más concentrados, pudiendo emplearse biorreactores con volúmenes de operación relativamente pequeños.
- iii) El sustrato sólido puede emplearse como se encuentra en la naturaleza adicionándole agua o bien, complementarlo con algún nutriente.
- iv) Las condiciones de crecimiento para los hongos en FES son más similares a las encontradas en su hábitat natural, donde se encuentran normalmente adheridos al material sólido.
- v) Los rendimientos en el producto pueden ser mucho más altos que los logrados en cultivos líquidos.
- vi) La aireación es facilitada por los espacios interpartícula.
- vii) En la interfase entre sustrato, microorganismo y fase gaseosa se dan condiciones muy favorables que permiten alcanzar velocidades de crecimiento superiores a las logradas en cultivo sumergido, aún a elevadas concentraciones de sustrato.
- viii) Los productos de la fermentación pueden extraerse fácil e inmediatamente por adición directa de solventes o bien mantenerse en refrigeración para su posterior extracción.
- ix) Los subproductos se pueden incorporar directamente a la alimentación animal.
- x) Los requerimientos de energía suelen ser reducidos.
- xi) Al utilizarse bajas cantidades de agua, se generan pocos efluentes contaminantes.

#### DESVENTAJAS:

- i) Las fermentaciones con agitación continua o de rotación pueden requerir un alto consumo de potencia.
- ii) Cuando se precisa adicionar agua en las etapas tempranas de la fermentación, puede ser causa de contaminación bacteriana.
- iii) La concentración de esporas en el inóculo es elevada.
- iv) Los sustratos agrícolas requieren de algún pretratamiento.
- v) Se necesita un desarrollo tecnológico considerable para que un proceso sea factible de escalarse.

- vi) Suelen presentarse problemas en la transferencia de calor y masa , que conducen al establecimiento de gradientes de temperatura, humedad, pH, sustratos, aireación, etc.
- vii) Las variables fisicoquímicas son difíciles de controlar.
- viii) La biomasa microbiana es difícilmente cuantificada por estar enlazada al sustrato sólido.

### 2.1.3 Microorganismos y sustratos

En las FES, los microorganismos pueden ser clasificados en dos grupos dependiendo de su origen. En el primer grupo se considera a la flora nativa del sustrato (ensilado y composteo) y en el segundo, a los cultivos axénicos y a los cultivos mixtos (procesos controlados para la obtención de un producto deseado) (Moo-Young y col, 1983).

Puesto que la mayoría de las bacterias requieren para su proliferación de altos niveles de humedad, las FES pueden excluir o reducir en gran medida el problema de la contaminación bacteriana. De tal forma que en las FES se provee un ambiente selectivo de baja humedad que favorece el crecimiento de hongos filamentosos aún a altas concentraciones de nutrientes (*Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* y *Penicillium*, principalmente) (Tengerdy, 1985). Siendo el género *Aspergillus*, ampliamente utilizado en la producción de ácidos orgánicos (gálico, cítrico, fumárico, glucónico y oxálico) (Lockwood, 1973) y algunas enzimas (celulasas, amilasas, glucoamilasas, pectinasas,  $\beta$ -glucosidasa y proteasas) (Pandey, 1992).

Un sustrato sólido adecuadamente humectado debe tener en su superficie una película de agua que facilite la difusión de nutrientes hacia el microorganismo. Además, los canales entre partículas no deben contener agua para permitir la aireación del sistema y facilitar el crecimiento del microorganismo.

La mayoría de los sustratos orgánicos sólidos disponibles en la naturaleza son polímeros (polisacáridos, proteínas y ligninas) que normalmente son capaces de satisfacer las necesidades nutricionales de los hongos; aunque es común agregarles algún complemento. A los sustratos amiláceos y lignocelulósicos, frecuentemente es necesario practicarles un pretratamiento a fin de facilitar su degradación. Los sustratos (fuentes de carbono y energía) que han sido empleados en FES son: residuos de remolacha, plátano, maíz, yuca, bagazo de caña, pulpa de café, cáscara cítrica, salvado de trigo, arroz y soya (Pandey, 1992).

Las FES han sido clasificadas de acuerdo a las características nutricionales del

sustrato (Ralph, 1976), donde:

- 1) El sólido es la principal fuente de nutrientes.
- 2) El sólido es nutricionalmente inerte, como en el caso de soportes impregnados con nutrientes.

## **2.2 EMPLEO DE LOS SOPORTES EN FES.**

El crecimiento de microorganismos, su consumo de sustratos y formación de productos en cultivos sumergidos pueden ser determinados con relativa facilidad. Sin embargo, en FES los datos de crecimiento de hongos son difíciles de obtener debido a la complejidad en la naturaleza nutricional y estructural del sustrato, a la heterogeneidad del sistema y a la dificultad para estimar la biomasa. Dificultades similares se han encontrado al intentar modelar los efectos de la transferencia de calor y masa.

Por tanto, es de vital importancia emplear un soporte modelo, en el que se puedan adicionar medios definidos con monosacáridos que faciliten el estudio del metabolismo y se puedan realizar comparaciones más cercanas entre las fermentaciones en estado sólido (FES) y cultivo sumergido, considerando que en este último proceso se ha recopilado la mayoría de la información básica.

### **2.2.1 Características del soporte modelo.**

Las características deseadas que debería cumplir un soporte modelo impregnado con una solución nutritiva son:

- i) No debe existir degradación microbiana de la matriz del soporte, conservando su geometría durante un proceso fermentativo.
- ii) No deben contener inhibidores del crecimiento microbiano que pudieran incorporarse al medio ya sea por liberación directa o por reacción con otros componentes de la solución nutritiva adicionada.
- iii) Deben ser rígidos y con espacios interpartícula constantes que permitan la aireación del sistema soporte-microorganismo.
- iv) Deben tener una alta retención de agua para lograr la actividad de agua necesaria para el crecimiento microbiano.
- v) No deben presentar interferencias con las técnicas analíticas.

### 2.2.2 Ejemplos de FES empleando soportes.

Oriol y col. (1988) emplearon como soporte al bagazo de caña y como microorganismo a *A. niger* en FES, estudiando el efecto de la actividad de agua, la cantidad de esporas inoculadas y el tamaño de partícula del soporte sobre el crecimiento. Realizaron cinéticas de producción de biomasa en función de la concentración inicial de glucosa, encontrando que la biomasa final y la fase de adaptación aumentaban conforme se elevaba la concentración inicial de glucosa; excepto para la última concentración estudiada (41.7%) en la que la biomasa aparentemente decayó y la fase de adaptación se incrementó aún más. Los autores no identificaron el origen de este efecto y sugieren se oriente más investigación al respecto.

Soccol (1992) realizó comparaciones entre fermentaciones en sólido y en líquido, empleando bagazo de caña como soporte con una cepa de *Rhizopus* como microorganismo productor de ácido láctico, encontrando que: i) la concentración óptima de glucosa para la producción de ácido láctico en el medio líquido es de 120 g/l, en tanto que en sólido es de 180 g/l; ii) la producción máxima de ácido láctico en líquido es de 94 g/l, contra 137 g/l en sólido; iii) la productividad de ácido láctico en líquido es de 1.38 g/h\*1 y en sólido es de 1.43 g/h\*1; iv) el rendimiento de la fermentación es de 77% en ambos casos. Los resultados de Soccol muestran que la FES ofrece ventajas con respecto a la fermentación en líquido para la producción de ácido láctico.

Auria y col. (1990) emplearon a la amberlita IRA-900 como un soporte modelo en FES con *A. niger*. En este trabajo, se encontró un bajo rendimiento en la producción de biomasa a partir del sustrato consumido y una correlación entre la caída de presión y la producción de biomasa. Los autores recomiendan el uso de este soporte (previo tratamiento) y señalan sus siguientes características para ser considerado como un soporte modelo: inerte, sin cargas durante la fermentación, crecimiento superficial, biomasa fácilmente removible, forma esférica y densidad de empaque homogénea.

Estudios realizados en este laboratorio (datos no publicados), utilizando bagazo de caña como soporte y *A. niger* como inóculo, han sugerido un desacoplamiento metabólico a altas concentraciones de sacarosa, en el que la biomasa y CO<sub>2</sub> producidos no justifican el elevado consumo de sacarosa (90%) en un lapso de 24 h. Fueron detectadas caídas drásticas del pH (de 4.5 a 1.5) y no se encontró ácido cítrico como producto.

## 2.3 CRECIMIENTO FUNGICO.

El crecimiento de hongos filamentosos en FES es diferente al patrón seguido en cultivo sumergido (Moo Young y col., 1983). En cultivo sumergido, el crecimiento tiene lugar a partir de fragmentos de micelio consecuencia de un sistema agitado. Mientras que, en cultivo sólido el crecimiento fúngico es apical y tiene su origen desde la superficie del sólido. Sin embargo, en ambos tipos de cultivos (excepto cuando en cultivo líquido se forman pellets) se distinguen cuatro etapas del crecimiento; a saber, fase de adaptación, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. Cuando el hongo crece en diferentes concentraciones iniciales de sustrato, suele presentar una curva típica de la relación de Monod.

### 2.3.1 Ramificación.

Los hongos tienen una adaptabilidad significativa a nutrientes y condiciones ambientales que les permiten colonizar sus sustratos. La característica de los hongos filamentosos que les permite crecer en sustratos sólidos es referida a su largo cuerpo tubular que envuelve a la partícula sólida, haciendo contacto con la película superficial de líquido que cubre al sustrato, disponiendo de nutrientes y de agua. Además, debido a que su crecimiento es apical (Trinci, 1971), sus puntas pueden penetrar por poros y grietas del sólido para proveerse de nutrientes. Más aun, los hongos pueden secretar enzimas por la zona apical del micelio que degradan polímeros, como sucede con *Aspergillus niger* en la secreción de glucoamilasa (Wösten y col, 1991).

El micelio del hongo puede ramificarse invadiendo la superficie del sustrato. Este mecanismo de ramificación parece estar influenciado por las concentraciones de AMP y GMP cíclico (Robson y col., 1991), deduciéndose que a una alta concentración de glucosa, los niveles de ATP son altos, mientras que los niveles de AMP permanecen bajos, por tanto, puede hablarse de una alta ramificación; esto puede observarse en los estudios de Trinci (1971) con *Aspergillus nidulans*. Con esta ramificación se llega a formar una red que limita el crecimiento, llegando a cubrir sólo alrededor del 10 al 15% de los espacios vacíos interpartícula al finalizar el cultivo en la mayoría de las FES (Laukevics y col. 1985). Este reducido espacio interpartícula contribuye a la baja concentración de biomasa en la FES.

### 2.3.2 Crecimiento balanceado

Los requisitos para lograr un crecimiento balanceado (incremento en la biomasa con velocidades constantes de consumo de nutrientes) en un cultivo son (Pirt, 1975a): inóculo viable, fuente de energía, todos los nutrientes necesarios, no contener inhibidores y condiciones fisicoquímicas adecuadas. Además, para que la ley de crecimiento exponencial sea válida se deben mantener las condiciones ambientales y la constitución de la biomasa constantes.

El crecimiento balanceado es exponencial y así continúa hasta que algún nutriente se agota o aparece un inhibidor. Si se garantiza que el oxígeno no limite al crecimiento fúngico, se pueden tener las siguientes situaciones (Bull y Bushell, 1976):

- a) Con el agotamiento de fosfato y magnesio, el metafosfato endógeno se utiliza y el crecimiento continúa con una velocidad lineal hasta el agotamiento de C o N (fase de transición).
- b) Al agotarse el nitrógeno, el crecimiento se detiene pero la síntesis de lípidos y carbohidratos continúa (fase de almacenamiento).
- c) Cuando toda la fuente de carbono y energía es consumida en un medio agotado en N, conduce a una fase de mantenimiento durante la cual los lípidos endógenos son metabolizados y en su eventual agotamiento empieza la autólisis (fase terminal).

### 2.3.3 Formación de productos y energía de mantenimiento

Durante las fases de crecimiento microbiano, frecuentemente se biosintetizan productos inherentes a cada cepa y a las condiciones nutricionales y ambientales en que se cultivan.

En un crecimiento balanceado, normalmente el metabolismo se regula para producir los metabolitos esenciales (unidades de las estructuras celulares: aminoácidos, nucleósidos, azúcares, ácidos grasos etc.) estrictamente necesarios para la supervivencia y reproducción del microorganismo.

Sin embargo, en un crecimiento desbalanceado y/o en condiciones ambientales lejanas a las óptimas para el crecimiento armónico, pueden ocurrir desviaciones en las rutas metabólicas e iniciarse la biosíntesis de metabolitos no esenciales. Por ejemplo, en *A. niger* la biosíntesis de glicerol puede ser influenciada por una fuerte aireación y una temperatura baja (25 °C) (Visser, 1991); y la acumulación de ácido cítrico es estimulada por las concentraciones elevadas de azúcares, la fuente de nitrógeno y su concentración,

la concentración de fosfatos, los elementos traza ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ), el pH, etc.

Además, el metabolismo celular se regula para generar la energía necesaria no sólo para su crecimiento, sino para su mantenimiento. Cuando el microorganismo es sometido a un estrés osmótico, es capaz de: sintetizar solutos compatibles para su osmorregulación (ver 2.5.1), cambiar la composición de su membrana celular para mantener en su interior a los solutos compatibles y reparar estructuras dañadas durante un choque osmótico.

## 2.4 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

El metabolismo de hongos en FES es objeto de las mismas leyes bioquímicas que rigen a los cultivos sumergidos. Actualmente, el estudio del metabolismo de carbohidratos en *Aspergillus niger* se ha orientado hacia tres áreas (Visser, 1991):

- i) El papel que desempeñan los polioles en el metabolismo del hongo.
- ii) Regulación de la biosíntesis de glucosa oxidasa.
- iii) Estructura y función de genes glicolíticos que codifican para el control de enzimas en glicólisis y su uso potencial para influenciar el metabolismo primario.

En el presente trabajo, se abordará el primer punto, orientándolo hacia los fenómenos de osmorregulación y su vinculación con la acumulación de ácido cítrico; ya que la osmorregulación es un mecanismo que el microorganismo empleará para contrarrestar los efectos osmóticos de las elevadas concentraciones de glucosa que serán usadas en las FES; y además, *Aspergillus niger* es el principal microorganismo productor de ácido cítrico (Marison, 1988b).

### 2.4.1 Osmorregulación

El crecimiento de microorganismos requiere de estar en contacto con una solución, en la interfase líquido-sólido o líquido-gas, o en la superficie de geles, porque deben obtener sus nutrientes directamente de una solución. La concentración de solutos en la solución determina la disponibilidad de agua para el microorganismo; de tal forma, que la fuerza osmótica es uno de los parámetros físicos que influye en el crecimiento microbiano en un hábitat dado. La capacidad de los microorganismos para adaptarse a

las fluctuaciones osmóticas del entorno es vital para su supervivencia. Estos mecanismos de adaptación se dan por regulación de solutos intracelulares, proceso denominado osmorregulación (Csonka, 1989).

#### **2.4.1.1 Potencial de turgor**

Normalmente, la concentración en solutos intracelulares es mayor que la concentración externa en el medio de cultivo, lo que influencia la difusión de moléculas de agua al interior de las células. Esta difusión provoca un aumento de la presión ejercida por la membrana citoplasmática hacia la pared celular; esta presión se denomina presión de turgor (Csonka, 1989).

Las paredes celulares no son completamente rígidas y la presión de turgor es propuesta para proveer la fuerza mecánica para la expansión de las paredes celulares durante el crecimiento (Blomberg y Adler, 1992). En relación a esta idea, la captura o biosíntesis de osmorreguladores causa un incremento en la osmolaridad del citoplasma, la cual es acompañada por la entrada de agua a las células, proveyendo la presión de turgor necesaria para expandir las paredes celulares. Sería posible que los procesos que regulan el balance osmótico de los microorganismos sean centrales para los procesos de crecimiento celular. El modelo de crecimiento para hongos propuesto por Trinci (1971), implica la expansión continua de las puntas miceliales, dejando espacios abiertos que son llenados por precursores de pared, sintetizados en lugares de la hifa donde no hay un crecimiento activo.

En la ausencia de un ajuste osmótico, cuando las células son expuestas a osmolaridades externas altas, el agua intracelular tiende a salir, la presión de turgor disminuye, el volumen celular disminuye y la concentración de solutos intracelulares aumenta. Puesto que las altas concentraciones de algunas moléculas intracelulares pueden ser inhibitorias para los procesos metabólicos (inhibición de enzimas), la alteración pasiva del volumen celular no es adecuada para adaptarse a cambios en la osmolaridad del ambiente, por lo que el hongo utiliza mecanismos alternativos.

### 2.4.1.2 Solutos compatibles

Los solutos compatibles son aquellos empleados por el microorganismo para osmorregular su citoplasma con el medio ambiente, que pueden ser biosintetizados o bien, capturados del medio (si existen en él) y que causan el mínimo efecto inhibitorio en las actividades enzimáticas del microorganismo (Brown, 1978). Los solutos compatibles, además de funcionar como osmorreguladores, pueden jugar un papel importante en hongos como reserva de fuentes de carbono y energía y como compuestos de traslocación (Blomberg y Adler, 1992). Los principales solutos compatibles (polioles) que han sido identificados en *A. niger* son : glicerol, eritrol, arabinitol y manitol (Adler y col., 1982); de los cuales el principal poliol osmorregulador es el glicerol, probablemente por ser el más pequeño, ya que desde el punto de vista de economía del carbono representa la forma más efectiva para la osmorregulación.

La síntesis del glicerol ha sido descrita por varias rutas (Legiša y Matthey, 1986a y b). Una involucra intermediarios fosforilados y consiste en la conversión de dihidroxiacetona-3-fosfato a glicerol-fosfato, catalizada por la glicerol-fosfato-deshidrogenasa y la glicerofosfatasa. La glicerol-deshidrogenasa dependiente del  $\text{NAD}^+$  y la dependiente de  $\text{NADP}^+$  transforman directamente la dihidroxiacetona a glicerol. Al obtener un extracto enzimático crudo de *A. niger*, se identificaron dos isoenzimas de la glicerol deshidrogenasa dependiente de  $\text{NADP}^+$ , una citoplasmática y otra mitocondrial; y se evidenciaron cambios en las relaciones de una HMP (pentosafosfato) predominante en las primeras etapas de cultivo de *A. niger* a una EMP (glucólisis) predominante en la etapa terminal del crecimiento (Legiša y Matthey, 1988). Este cambio en las relaciones de rutas metabólicas, también se ha encontrado en *Botrytis cinerea* (Donèche, 1989).

Además, ha sido propuesto que el ciclo del glicerol puede funcionar para mantener un balance apropiado  $\text{NADPH/NADP}$  (Schuurink y col., 1990)

### 2.4.1.3 Consumo del glicerol producido

Cuando el potencial osmótico aumenta como consecuencia del consumo de sustrato, los polioles almacenados son utilizados como fuente de carbono. En este contexto, en *A. nidulans* se encontraron glicerol-cinasa y glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa dependiente de FAD (mitocondrial) que catabolizaron al glicerol. Los niveles de ambas enzimas son controladas por represión catabólica e inducción específica. Se mostró que la dihidroxiacetona y gliceraldehído que son convertidos a

glicerol, pueden ser restaurados por la misma vía (en sentido inverso). El gliceraldehído puede ser reducido por la enzima glicerol deshidrogenasa dependiente del  $\text{NADP}^+$  o por la alcohol deshidrogenasa I; mientras que, la dihidroxiacetona es reducida exclusivamente por la primera enzima (Hondmann y col., 1991).

Cuando el crecimiento se detiene y aún el potencial osmótico externo es elevado, el glicerol desaparece y se sintetizan compuestos polihidroxilados superiores, ya que estos son menos permeables que el glicerol y son más fáciles de retener, aún cuando no son capaces de sustituir completamente al glicerol en términos de osmorregulación; sin embargo, el turgor mantenido puede no ser tan importante para células en reposo (Blomberg y Adler, 1992).

#### **2.4.1.4 Actividad de agua**

Es frecuente encontrar en artículos científicos diferentes términos usados para designar la presencia de solutos. La preferencia por el uso de algún término en particular se encuentra relacionado con el campo de trabajo y cuestiones históricas: presión osmótica, osmolaridad, potencial químico de agua, potencial osmótico, potencial de agua y actividad de agua ( $A_w$ ).

Un concepto que brinda información sobre el agua disponible para las funciones metabólicas de los microorganismos es la  $A_w$ ; puesto que en solución, las moléculas de agua están asociadas a los solutos disueltos, lo cual involucra un cambio en el estado del agua. La  $A_w$  puede definirse como la humedad relativa de la atmósfera gaseosa que se encuentra en equilibrio con una solución (Pandey, 1992); o bien, como la relación de la presión de vapor de una solución entre la presión de vapor de agua pura (a la misma temperatura) (Pirt, 1975b).

Los hongos se cultivan selectivamente en sustrato sólido, puesto que sus actividades metabólicas pueden ser llevadas a cabo en sistemas de baja  $A_w$ . Es importante el manejo de este concepto, puesto que el crecimiento, esporulación y producción de enzimas están directamente influenciados por la  $A_w$  (Grajek y Gervais, 1987; Gervais y col. 1988).

Sin embargo, el término  $A_w$  tiene limitaciones en su uso, puesto que el efecto que un soluto tiene sobre un microorganismo es un reflejo no sólo de la  $A_w$ , sino además, de la naturaleza y número de moléculas del soluto. Existen evidencias que así lo demuestran, como son las investigaciones aportadas por Vaamonde y col. (1982, 1984)

y Gervais y col. (1988); donde encontraron que para una misma  $A_w$ , lograda con diferentes solutos, se tienen diferentes velocidades de crecimientos en *Staphilococcus aureus* y *Trichoderma viride*. Situaciones similares se han encontrado para actividades enzimáticas (Grajek y Gervais, 1987).

Un parámetro fisicoquímico que aporta más información que la  $A_w$  (como es el número de moléculas de soluto), es el potencial osmótico ( $\pi$ ) que se define como:  $\pi = (RT/V_m) (\ln A_w)$ , donde R es la constante de los gases, T es la temperatura,  $V_m$  es el volumen parcial molal.

#### 2.4.2 Transporte en membrana.

El primer evento para que el metabolismo tenga lugar, es el transporte de nutrientes a través de una membrana que separa los componentes intracelulares de su entorno. Debido a su naturaleza lipídica, las membranas son altamente selectivas impidiendo el paso de compuestos polares. Los compuestos polares solo pueden atravesar la membrana con ayuda de proteínas transportadoras específicas.

Existen dos tipos de transporte en membranas (Voet y Voet, 1990c): transporte no mediado, el cual tiene lugar por difusión simple; y el transporte mediado, que requiere la participación de proteínas acarreadoras específicas que son susceptibles a saturarse, ser inhibidas competitivamente y a inactivarse por químicos.

El transporte mediado puede tener dos clasificaciones acorde a la termodinámica del sistema: a) transporte pasivo, también llamado difusión facilitada, en donde las moléculas fluyen desde una alta a una baja concentración hasta equilibrar su gradiente de concentraciones; b) transporte activo, en donde las moléculas son transportadas desde una baja a una alta concentración; es decir, en contra de un gradiente de concentraciones. Este último proceso requiere de energía para llevarse a cabo.

Al parecer, el transporte de glucosa a través de la membrana esta restringido a dos sistemas de transporte controlados por represión e inactivación por glucosa (Brandao y Loureiro-Dias, 1990). En estudios de crecimiento con *Fusarium oxysporum* bajo condiciones de represión por glucosa, se forma un sistema de difusión facilitada; en tanto que bajo condiciones de desrepresión, está presente tanto el sistema de difusión facilitada como un transporte activo de alta afinidad.

Los factores que afectan la fluidez de la membrana son el tipo de ácidos grasos,

la cantidad de ergosterol y la naturaleza de los grupos polares de los fosfolípidos. Hosono (1992) investigó el efecto de elevadas concentraciones de NaCl en la composición de las cadenas lipídicas, encontrando que la fluidez de la membrana disminuye y se torna más rígida como consecuencia de la modificación en la longitud, el grado de insaturación y la ramificación de las cadenas de ácidos grasos; probablemente para mantener al glicerol dentro de las células.

### 2.4.3 Regulaciones metabólicas en la producción de ácido cítrico.

El hongo filamentoso *Aspergillus niger* es ampliamente usado para la producción a escala industrial de ácido cítrico. Los mecanismos bioquímicos que determinan la acumulación del ácido cítrico en *A. niger* ha sido motivo de estudio durante los últimos 50 años. Algunas levaduras y otros hongos se han empleado para la producción de ácido cítrico; sin embargo, *A. niger* es el microorganismo seleccionado en razón de: las materias primas baratas usadas como sustrato, los altos y consistentes rendimientos y la facilidad de su manejo.

Se han propuesto algunas teorías que involucran la participación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) a diferentes puntos de regulación durante la acumulación de ácido cítrico. Enzimas tales como la aconitasa, la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (CGDH) y la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) han merecido investigaciones tendientes a dilucidar su participación durante la acumulación de cítrico. La CGDH y la ICDH tienen en común que catalizan las reacciones con energías libres negativas; es decir, reacciones que ocurren espontáneamente, y en conjunto con la citrato sintasa, son consideradas como los puntos de regulación del CAT (Voet y Voet, 1990b).

La aconitasa es la enzima que cataliza la reacción entre el citrato, el cis-aconitato y el isocitrato; los argumentos que fundamentan su papel regulador en la acumulación de citrato estriban en estudios *in vitro*, donde la acumulación de citrato disminuye en la presencia de hierro, el cual es un componente estructural y activador de la aconitasa. Además, el cobre y el peróxido de hidrógeno que inhiben a la aconitasa *in vitro*, actúan como estimuladores de la producción de cítrico (Bruckmann y Ramakrishnan; citados por Kubicek y Röhr, 1985).

La  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa es un complejo multienzimático que cataliza la reducción del  $\alpha$ -cetoglutarato a succinil CoA. Es propuesto como responsable de la acumulación de ácido cítrico por ser altamente regulado y por ser considerado como el

sitio de control en el flujo de intermediarios del CAT (Voet y Voet, 1990b).

La ICDH, es la enzima que media la reacción entre el isocitrato y el  $\alpha$ -cetoglutarato. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que es inhibida por concentraciones fisiológicas de citrato, en ausencia de iones  $Mn^{2+}$ . El manganeso es un elemento cuya presencia tiene un fuerte efecto negativo en la acumulación de citrato en *A. niger*, no sólo por ser requerido como cofactor de la ICDH (Legiša y Kidric, 1989), sino además, por actuar sobre los transportadores de membrana e influenciar la composición de la membrana causando la excreción de ácido cítrico en micelios que crecen en medios deficientes en este catión (Meixner y col., 1985).

Legiša y Kidric (1989) mostraron que la ICDH es extremadamente sensible a pequeñas disminuciones de pH (en pH ácido) y ellos observaron que durante la acumulación de cítrico ocurren decrementos del pH micelial en *A. niger* de 7.1 a 6.5. En dicha investigación, se mostró que el glicerol inhibe a la ICDH y es considerado como el iniciador de la acumulación de citrato.

Se han realizado estudios por Legiša y Matthey (1988), donde han evidenciado un cambio en el catabolismo de carbohidratos; de una ruta HMP predominante en las primeras etapas de crecimiento de *A. niger*, a una ruta glucolítica durante la producción de cítrico. El citrato, al inhibir a la 6 fosfogluconato-deshidrogenasa (6PGDH), detiene el catabolismo vía HMP (Fig. 2.1) y cesa la síntesis de glicerol. Cuando el glicerol desaparece, existe suficiente citrato dentro de las células para mantener bloqueada a la ICDH dependiente del  $NADP^+$ . Para una acumulación rápida de citrato se requiere de un flux glicolítico desinhibido, esta ruta depende de la actividad de la 6 fosfofructocinasa (6PFK) que es considerada como la enzima clave, por ser altamente regulada (Voet y Voet, 1990a) y puesto que es inhibida por el citrato, el mecanismo de su activación permanece sin explicación.

Evidentemente, es necesaria la síntesis continua de oxalacetato para que pueda llevarse a cabo la reacción de condensación con el acetyl CoA en la producción de ácido cítrico; las rutas anapleróticas que funcionan para satisfacer la demanda de oxalacetato son las siguientes (Marison, 1988b):

- i) La carboxilación directa de piruvato, catalizada por la enzima málica para producir malato, el cual es rápidamente oxidado a oxalacetato.
- ii) La carboxilación del piruvato, catalizada por la piruvato-carboxilasa.
- iii) La carboxilación de fosfoenol piruvato (PEP), catalizada por la PEP-carboxicinas.
- iv) La ruta del glioxalato que involucra a las enzimas isocitrato-liasa y malato-sintasa.



## **MATERIALES Y METODOS**

### 3 MATERIALES Y METODOS

Los procedimientos metodológicos fueron clasificados en dos subcapítulos, el primero reúne las metodologías conocidas en el ambiente científico, y el segundo a las que se desarrollaron durante este estudio, respecto a la estimación de la biomasa y al tratamiento del soporte. Sin embargo, las consideraciones particulares para cada experimento se incluyen en su respectiva sección de resultados.

#### 3.1 FUENTE DE REACTIVOS

Se usó agua desionizada en el transcurso de toda la investigación.

En los experimentos, se emplearon solamente reactivos grado analítico de la siguiente fuente:

Baker analyzed: glucosa anhidra,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  
 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  
 piridina, anhídrido acético, etanol (90%),  $\text{NaOH}$ , ácido cítrico y  
 $\text{H}_3\text{PO}_4$

Bioxon: agar papa-dextrosa (PDA)

Difco: leche descremada.

Oxiod: agar

Rohm and Haas: Amberlita IRA-900 (código: 6-9385, No. lote: 90288).

Sigma: tween 80, Azul de Coomassie (90% de pureza), Seroalbúmina bovina, glicerol y eritrol

#### 3.2 EL MICROORGANISMO Y SU AISLAMIENTO

La cepa *Aspergillus niger* No. 10 fue seleccionada por los estudios fisiológicos previos que han sido desarrollados, siendo descrita por Rimbault y Alazard (1980) y Oriol y col. (1988). De estos estudios se conocen aspectos básicos que permiten asumir que esta cepa es idónea para los objetivos que se persiguen en este trabajo (como su capacidad para crecer a elevadas concentraciones de glucosa).

Antes de proceder a su conservación, fue importante aislar la cepa para garantizar un cultivo axénico; ya que, la cepa era conservada en refrigeración en tubo inclinado.

La cepa de *Aspergillus niger* No. 10, se sembró por estría en cajas Petri con PDA (agar papa-dextrosa), se incubó por 2 días a 35 °C, se seleccionó una colonia bien definida y se repitió el procedimiento hasta completar cuatro ciclos.

### 3.3 MEDIO DE CULTIVO

Previo a la propagación, es importante contar con el medio de cultivo que contenga todos los requerimientos nutricionales de *Aspergillus niger* y que se apegue a los componentes del medio que serán usados en los estudios básicos del metabolismo durante la FES.

#### 3.3.1 Diseño

Se diseñó el medio de cultivo (Tabla 3.1) para la obtención de biomasa, acorde a la composición microbiana reportada por Roels (1977), Erickson (1978) y Aiba y col. (1973). En este diseño, la concentración de nitrógeno (N) se calculó en una cantidad equivalente para que el hongo consumiera 30 g de glucosa/l, considerando un rendimiento en la producción de biomasa con respecto a la glucosa consumida ( $Y_{x/s}$ ) de 0.5 y que la concentración de nitrógeno en la biomasa es de 11.3 % que corresponde a una composición promedio en la biomasa microbiana (Roels, 1980).

Tabla 3.1 Medios de cultivo.

	A	B	C	D
Glucosa	30	30	G	G
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.47	2.47	2.89	2.47
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	0.235	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.6	2.2	6.6	6.6
CaCl <sub>2</sub>	0.48	0.48	0.48	0.48
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.38	0.38	0.38	0.38
NaCl	0.32	0.32	0.23	0.23
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.124	0.124	0.124	0.124
Oligoelementos*	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Agar	-	-	12.5	-

Donde A es el medio diseñado para la obtención biomasa; B, C y D son las modificaciones para la producción de esporas, para el cultivo superficial y para las FES, respectivamente.

NOTA: Los componentes del medio están expresados en g/l. G es la concentración de glucosa, la cual es definida en 3.5.5 y 3.6.2. La solución de oligoelementos\* es similar a la reportada por Clutterbuck (1974), a la cual le fue eliminada el FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y el EDTA.

El medio diseñado para la obtención de biomasa fue modificado de acuerdo a las

necesidades del experimento, ya sea para fines de inóculo (esporas), para cultivo superficial o para las FES (Tabla 3.1).

Al medio de cultivo para crecimiento en cultivo superficial se le modificó la composición de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en equivalentes molares de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  para alcanzar un pH de 4.95 y asegurar la solidificación del medio. En este medio, ocurre un crecimiento muy abundante que tiene lugar no sólo a nivel superficial, sino que penetra en el agar, formándose una capa gruesa que puede desprenderse fácilmente del medio semisólido.

### **3.3.2 Esterilización**

Los medios de cultivo para cultivo superficial se esterilizaron a 15 PSI por 10 min, tratando que los tiempos de calentamiento y enfriamiento fueran mínimos. En el caso de los medios de propagación (para la producción de esporas), se esterilizaron a 15 PSI por 15 min.

## **3.4 TECNICAS DE CONSERVACIÓN**

### **3.4.1 Congelación**

La congelación con glicerol garantiza la viabilidad de las células por meses (Chang y Elander, 1986); por consiguiente, la cepa así conservada fue la utilizada rutinariamente. La función del glicerol es de brindar a las células un efecto protector ante el congelamiento.

Con la suspensión de esporas, se inocularon 10 matraces de 250 ml, se incubaron por 4 días a 35 °C, se cosecharon y se contaron las esporas ( $2^{10}$  esporas/ml).

Se esterilizó glicerol a 15 PSI por 20 min y se agregó a la suspensión de esporas (en una concentración entre  $1 \cdot 10^9$  y  $1 \cdot 10^{10}$  esporas/ml); tal que se obtuvo una concentración final de glicerol del 15% (v/v). La suspensión (1 ml) se almacenó en refrigeración (Nieto, mod. CVC15) en tubos de microcentrífuga a -20 °C.

### **3.4.2 Liofilización**

La conservación por liofilización garantiza la viabilidad de la cepa por más de 10 años (Chang y Elander, 1986). El microorganismo se seca en condiciones de vacío, a una temperatura de -50 °C y en presencia de un crioprotector.

Se esterilizó una solución al 20% de leche descremada a 15 PSI durante 15 min. Se llevó a cabo una dilución 1:10 de la suspensión de esporas con la solución de leche descremada, se agregó 0.5 ml por ampolleta (de borosilicato) y se procedió la liofilización (liofilizador, Labconco, mod. E2M5).

### 3.5 PRODUCCION DEL INOCULO

La spora es la forma de reproducción del hongo que con más frecuencia se utiliza para el inóculo de un cultivo. Una de las desventajas previamente señaladas en las FES, se refiere a la gran cantidad del inóculo que se requiere, siendo necesario contar con un medio de cultivo que estimule la esporulación.

#### 3.5.1 Estimulación de la esporulación

La falta de esporulación y la abundancia en el desarrollo micelial de *Aspergillus niger* en el medio diseñado para la obtención de biomasa (Tabla 3.1, medio A) parece relacionarse con un correcto balance del medio de cultivo, donde ningún nutriente limita el crecimiento.

Sin embargo, para cuestiones de obtención del inóculo era necesario provocar la esporulación. Por investigaciones de Broderick y Greenshields (1982), se sabía que la limitación por nitrógeno podía estimular la conidiación de *A. niger*, por tanto, se optó por disminuir la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a la tercera parte de lo estipulado en el diseño (Tabla 3.1), logrando hacer esporular al hongo; que en términos generales significa, desviar la utilización de la glucosa de un crecimiento hifal con un medio bien balanceado, hacia la esporulación con un medio limitado en nitrógeno y hacia la síntesis de compuestos de reserva y de otros metabolitos secundarios asociados con la disminución de la velocidad de crecimiento (Broderick y Greenshields, 1982).

#### 3.5.2 Propagación

Un tubo de microcentrífuga en donde se conservó con glicerol la cepa *A. niger* No. 10, se calentó a 30 °C mediante un baño de agua, se abrió y se inoculó asepticamente en matraces de 250 ml conteniendo medio de propagación (Tabla 3.1, medio B) y se incubó a 33 °C por 5 días.

#### 3.5.3 Cosecha de esporas

A un matrás con el hongo propagado (esporulado) se le agregó 30 ml de una

solución de Tween 80 (0.1%), en condiciones asépticas y con un agitador magnético se desprendieron las esporas para obtener una suspensión.

#### **3.5.4 Conteo de esporas**

A la cámara de Neubauer se le agregó una capa de suspensión de esporas con la dilución pertinente para lograr una cuenta entre 20 y 60 esporas por cuadro. Al microscopio (American Optical, mod. 1031), con el objetivo de 40X, se contaron las esporas de 10 cuadros seleccionados al azar. El número de esporas por cuadro, se transformó a concentración de esporas (esporas/ml), al considerar que 25 cuadros contienen  $1 \times 10^{-4}$  ml. Las esporas que normalmente se contaron en este medio y bajo estas condiciones de incubación son del orden de  $5 \times 10^8$  esporas/ml.

#### **3.5.5 Inoculación en cultivo superficial**

Se espató (distribuir con triángulo de vidrio) 0.1 ml de suspensión de esporas recientemente propagadas, en cajas Petri que contuvieron 30 ml del medio para cultivo superficial (Tabla 3.1) con una área superficial de  $54.1 \text{ cm}^2$ , y se incubaron a  $33 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 días. Las concentraciones de glucosa estudiadas en este medio fueron de 20, 50, 100, 150, 200, 300, 400 y 500 g/l.

#### **3.5.6 Cultivo superficial para observar el efecto del tratamiento de la resina en el hongo.**

Un medio de cultivo con 100 g/l de glucosa (ver sección 3.2.1) se agregó a la resina seca tratada (ver 3.8.2) o sin tratamiento en una relación 4:1; manteniéndose en contacto a  $35^\circ\text{C}$ , durante 3 h, junto a un testigo (sólo medio de cultivo). Cada uno de los medios fueron diluidos 1:2 y se filtraron. En caso de ser necesario, a los medios filtrados se les ajustó el pH a 4.95; se les agregó agar y se esterilizaron. Se tomaron muestras del filtrado antes del ajuste de pH, se diluyeron 1:12.5 y se analizaron los aniones por HPLC (3.6.4).

Cada medio se vació (35 ml) en cajas de Petri, se inoculó (ver 3.5.5) y se incubaron a  $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los análisis que se practicaron fueron (por triplicado): peso seco y glucosa (ver 3.7.1).

### **3.6 MONTAJE DE LAS FES**

Las FES se montaron de acuerdo a la metodología propuesta por Raimbault y Alazard (1980).

#### **3.6.1 Columnas**

Las columnas de vidrio (ver fotografía al final del capítulo), con un diámetro interno de 1.1 cm y una altura de 15 cm (con una entrada reducida, para la aireación), se les colocó un tapón de fibra de vidrio para evitar la salida de materiales, no obstruir la entrada del aire y para evitar la competencia por el agua con el material que se fermenta. Se llenaron con 7 g de resina impregnada con medio de cultivo e inóculo, en una relación de 1g de resina seca por 1.5 ml de medio, lográndose una altura de empaque de 10.6 cm. Encima del empaque (sin que lo toque) se colocó un tapón de algodón para absorber los condensados.

#### **3.6.2 Condiciones de cultivo**

Temperatura de incubación: 35 °C

Flujo de aire: 3 l/h.

Inóculo:  $2.7 \times 10^7$  esporas/g de resina seca

Relación de medio de cultivo - resina: 1.5:1

Condiciones de esterilidad: ninguna

pH inicial: 4.5

Concentración de glucosa: 50, 100, 200, 300 y 400 g/l. Dentro de los capítulos 5 y 6, se designaron a las fermentaciones con F50, F100, F200, F300 Y F400, relacionadas a la concentración inicial de glucosa

#### **3.6.3 Inoculación**

La suspensión de esporas se agregó al medio de cultivo al final de su preparación (antes de aforar), justo antes de montar la FES y se agitó. El medio con esporas se agrega a la resina seca (RS) y se mezcla uniformemente.

### **3.7 TECNICAS ANALITICAS**

#### **3.7.1 Análisis de glucosa, peso seco y ácido cítrico en cultivo superficial**

El contenido de una caja Petri se vació en un vaso de precipitado (500 ml), se adicionaron 200 ml de agua y se calentó en horno de microondas por 3 min. Una vez

fundido el agar, se filtró con papel Watman No. 41 (a peso constante) en caliente, se lavó con 100 ml de agua caliente. El filtrado se aforó a 500 ml, cuantificándose la glucosa con el analizador enzimático de glucosa y lactato (YSI, mod. 2000). La biomasa en el papel filtro se secó a 60°C, durante 24 h y se cuantificó el peso seco.

Para el análisis del peso seco, se verificó que los residuos de agar no interfirieran con la técnica, al filtrar medio gelificado sin inocular y al comparar el peso seco antes y después de la filtración. Esta metodología fue válida para este medio de cultivo (Tabla 3.1, medio C); ya que el micelio de *A. niger* se funde y forma una capa compacta fácilmente removible y sin esporulación.

El ácido cítrico se analizó cualitativamente por el método de Marier y Boulet (1958). Procedimiento: A 1 ml de muestra, se le agregó 1.3 ml de piridina, se agitó, se le adicionó anhídrido acético, se agitó y se observó la generación de color.

### 3.7.2 Muestreo de las columnas

El número de columnas empleadas en cada fermentación, así como el número de columnas sacrificadas en cada tiempo de análisis y el lapso de tiempo en el que se realizó el muestreo (durante la fase de crecimiento exponencial) se presenta en la Tabla 3.2.

Cabe señalar que el contenido de la columna tomada, se homogeneizó antes de sus análisis respectivos.

Tabla 3.2 Número de columnas empleadas en los análisis.

Fermentación	TC*	NC*	TA*
F50	16	2	4
F100	18	2	4
F200	19	2	4
F300	20	1	2
F400	22	1	2

Donde TC es el total de columnas empleadas en la fermentación, NC es el número de columnas sacrificadas a cada tiempo de análisis y TA es el lapso de tiempo (h) para el muestreo durante la fase de crecimiento exponencial. F50, F100, F200, F300 y F400, representan a las fermentaciones a 50, 100, 200, 300 y 400 g de glucosa/l.

### 3.7.3 Análisis fisicoquímicos

#### Humedad

1 g de muestra fermentada se secó a 60 °C durante 24 h, la diferencia de pesos entre la resina húmeda y seca, se reportó como humedad. La resina seca se estimó al restar a la materia seca, la cantidad de glucosa, biomasa, ácidos orgánicos y polioles.

#### Actividad de agua

La muestra se colocó un poco abajo de la mitad de una caja que acompaña al aparato para la medición de la actividad de agua (Aw) (Decagon, mod. cx1) y se procedió su análisis.

#### pH

A 1 g de materia fermentada (resina+medio+hongo), se le agregó 10 ml de agua, se agita y se mide el pH (conductronic, mod. 20).

### 3.7.4 Análisis de glucosa en FES

Del sobrenadante para la medición del pH, se tomó una muestra (antes de medir el pH) y se realizó la dilución pertinente para que la concentración de glucosa se ubique entre 1 y 10 g/l, y se midió con el analizador enzimático de glucosa y lactato YSI (mod. 2000).

### 3.7.5 Análisis de aniones

Para el análisis de aniones, la muestra se tomó del sobrenadante usado en la medición del pH (3.7.3) y se analizó por HPLC. La instrumentación del HPLC (Perkin Elmer), se enlista a continuación:

Bomba isocrática y binaria modelo LC-250, inyector (Rheodyne) modelo LC-7125, integrador modelo LC-1020. Accesorios: Kit de filtración de solventes Alltech, jeringa Hamilton (100 µl), sonicador Branson 2200.

Las condiciones cromatográficas empleadas en este análisis fueron (Cassidy y Elchuk, 1983):

Columna: Spherisorb ODS2 5µ

Fase móvil: 1 mM de hidróxido de tetrabutilamonio ajustado a pH de 6.56 con una solución saturada de ácido ftálico (filtrar y desgasificar).

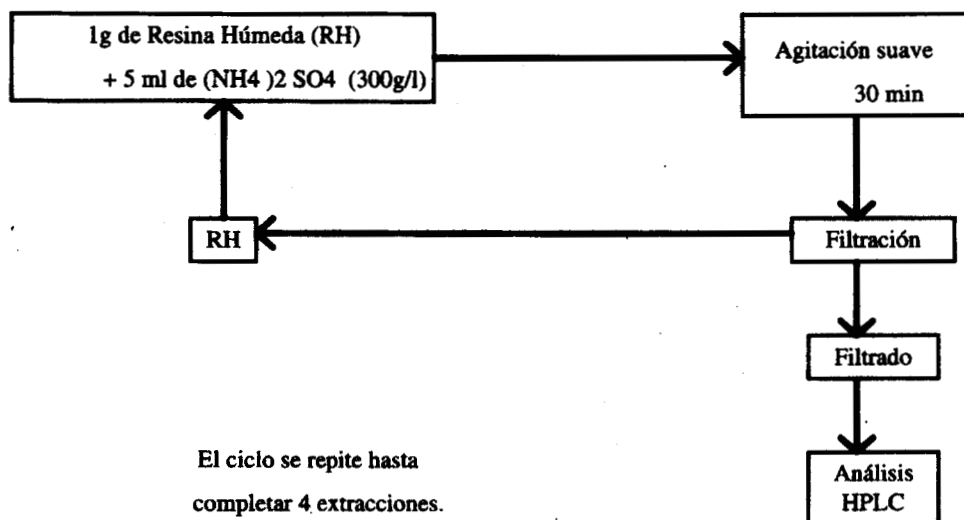
Velocidad del flujo: 1.3 ml/min

Volumen de la inyección: 20  $\mu$ l

Detección: Fotometría indirecta a 280 nm (espectrofotómetro UV/VIS modelo LC-290).

### 3.7.6 Análisis de ácidos orgánicos

Previo al análisis, la muestra de la FES se sometió a un procedimiento de extracción de los ácidos orgánicos, puesto que una fracción importante son adsorbidos por la resina de intercambio aniónico (aproximadamente el 75%). El procedimiento de extracción se esquematiza en el diagrama de bloques siguiente:



El análisis por HPLC, se realizó con la misma instrumentación de 3.7.5 y con las siguientes condiciones cromatográficas:

Columna: Spherisorb ODS2 5 $\mu$

Fase móvil: 4.356 g  $K_2PO_4$  + 2.07 ml  $H_3PO_4$  (85%) aforado a 1l con agua (filtrar y desgasificar).

Velocidad del flujo: 1.6 ml/min

Volumen de la inyección: 20  $\mu$ l

Detección: Fotometría a 214 nm (espectrofotómetro UV/VIS modelo LC-290).

### 3.7.7 Análisis de polioles

La muestra para el análisis de polioles por HPLC se tomó del sobrenadante utilizado para analizar la glucosa (3.7.4). El HPLC presentó la misma instrumentación que 3.7.5 y las condiciones cromatográficas fueron:

Columna: Econosil NH<sub>2</sub> 10 μ

Fase móvil: acetonitrilo: agua (80:20) (filtrar y desgasificar).

Velocidad del flujo: 2 ml/min

Volumen de la inyección: 20 μl

Detección: índice de refracción (modelo LC-30)

## 3.8 TRATAMIENTO DEL SOPORTE

La resina (Amberlita IRA-900) originalmente viene en su forma iónica de cloruros, se lavó con una relación 1:40 de resina húmeda-agua; se secó a 60 °C durante 36 horas y se guardó en un desecador.

A menos que se aclare lo contrario, en los experimentos se usaron, una relación de 4 ml de solución conteniendo el anión de interés por gramo de resina seca (RS) para evaluar la interacción de los aniones con las resinas tratadas.

### 3.8.1 Tratamiento con fosfatos

A 1 g de RS se le agregaron 4 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 M, se mantuvo en contacto durante 1h a 35 °C, se lavó y se almacenó en desecador. Estas condiciones en el tratamiento fueron dilucidadas de los experimentos A.1 y A.5 localizados en el Anexo.

### 3.8.2 Tratamiento propuesto

Tabla 3.3 Tratamientos aplicados a la resina:

g/l	1	2	3	t
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	63	51	34	34
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150	26	16.5	33
NaCl	50	26	10	0

**Nota:** t corresponde al tratamiento propuesto.

Para el tratamiento, la soluciones salinas (Tabla 3.3) se agregaron a la resina húmeda (RH) en una relación de 2:1, se mantuvo en contacto 1 h a 35 °C; se filtró y se adicionó solución salina nueva, repitiendo el procedimiento hasta completar cuatro

tratamientos; se lavó y se secó.

La necesidad de emplear por cuatro tratamientos sucesivos de 2 ml de solución aniónica por g RH provino del experimento A.8.

### 3.9 ESTIMACION DE LA BIOMASA EN UN SISTEMA DE FES

Antes de abordar las FES, fue necesario contar con un método para estimar la biomasa, puesto que tiene primordial importancia para los estudios cinéticos. Los métodos ampliamente utilizados para cuantificar proteína tienen interferencias; con Lowry, la glucosa y con Kjeldahl, el nitrógeno de la resina y del medio.

La opción que se consideró, consistió en la práctica de una hidrólisis directa del hongo creciendo sobre la resina y un posterior análisis de la proteína con el método del colorante ligado a proteína (Anexo B).

Las condiciones óptimas para la hidrólisis del micelio de *Aspergillus niger* fueron: una concentración 0.25 M de  $H_3PO_4$  y un tiempo de reacción de 7 min.

Cabe señalar que los componentes del sistema de FES, no interfirieron en la cuantificación de proteína cuando se empleó una hidrólisis ácida; mientras que, una hidrólisis alcalina promovió la reactivación de la resina adsorbiendo la proteína y subestimando su cuantificación. Además, la respuesta del colorante ligado a la proteína en la estimación de la biomasa cambió cuando se modificó la concentración inicial de glucosa a la cual se cultivó el hongo, siendo necesaria la construcción de curvas estándares con biomásas cultivadas en caja Petri a la misma concentración de glucosa a la cual se llevó a cabo una FES.

#### 3.9.1 Procedimiento

A 1g de resina húmeda (fermentada) se le agregó 5 ml de  $H_3PO_4$  0.3 M y se mantuvo 7 min en baño de agua a ebullición, se enfrió, se centrifugó 1.5 ml del filtrado a 14000 R.P.M. durante 1 min, se tomó 1 ml del sobrenadante, se le agregó 5 ml del reactivo Azul de Coomassie y se leyó la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro (Shimatzu, uv-160A), tomando como referencia (blanco) 1 ml de una solución de  $H_3PO_4$  0.25 M + 5 ml del reactivo.

### 3.9.2 Curvas estándares

Para preparar las curvas estándares, se repitió el procedimiento anterior, pero en lugar de la resina, se agregó 1ml de suspensión de micelio de *A. niger*.

Las suspensiones de micelio (1.67 g/l) se prepararon con biomásas obtenidas por cultivo superficial (ver sección 3.5.5) a las concentraciones iniciales de glucosa de 50, 100, 200, 300 y 400 g/l, incubadas durante cinco días a 32 °C. La capa de micelio se desprendió de la fase semisólida, se sumergió en 200 ml de agua hirviendo por menos de un minuto (dentro de un horno de microondas), se filtró en caliente (papel Whatman 41) y se enjuagó con 150 ml de agua caliente. La biomasa se secó sobre papel aluminio a 60 °C durante 24 h, se molió con un mortero, se regresó a la estufa (12h a 60 °C), se pesó, se agregó solución de  $H_3PO_4$  0.25M y se molió con un macerador de tejidos.

### 3.9.3 Preparación del reactivo Azul de Coomassie

Se parte de la metodología original de Bradford (1976), realizando algunas modificaciones para adecuarlo a las necesidades del presente trabajo. Se considera que la proteína que se libera durante la hidrólisis del micelio es baja y por tanto un volumen pequeño para el análisis de la muestra es inapropiado; además, puede representar errores de manipulación. El volumen de análisis que se toma de manera rutinaria es de 1 ml.

El reactivo, según Bradford (1976), se prepara disolviendo 100 mg de Azul de Coomassie en 50 ml de etanol, se agita durante 8 h, se le agrega ácido fosfórico, se agita y se afora a un litro con agua.

**ESTUDIO DEL INTERCAMBIO  
IONICO DE LA AMBERLITA IRA-  
900.**

#### 4 ESTUDIO DEL INTERCAMBIO IONICO DE LA AMBERLITA IRA-900. Características de la amberlita IRA-900

La amberlita IRA-900 es una resina macrorreticular de intercambio aniónico base fuerte, constituida por poliestireno de trimetil amonio, cuyas propiedades físicas y químicas aparecen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Propiedades físicas y químicas de la amberlita IRA-900 (Rohm and Haas Company, 1984)

Forma	Esférica
Forma iónica	Cl <sup>-</sup>
Contenido de humedad	60%
Densidad aparente	0.64-0.72 g/ml
Tamaño de partícula	~0.53 mm
Capacidad de intercambio *	~4.2 meq/g RS
Limitaciones de pH	Ninguna
Limitaciones de temperatura	Soporta arriba de los 100 °C
Diámetro de poro	2.5-25 μm

\*La capacidad de intercambio es una medida de los grupos ionizables por unidad de masa o por unidad de volumen

El proceso de elaboración de la resina (Fig. 4.1), consiste en la polimerización de estireno con divinilbenceno (DVB), de una clorometilación del polímero y una posterior aminación (Sherma, 1972). Después de la aminación, el polímero que tenía una naturaleza hidrofóbica, toma un carácter iónico con el cual es capaz de retener agua y iones.

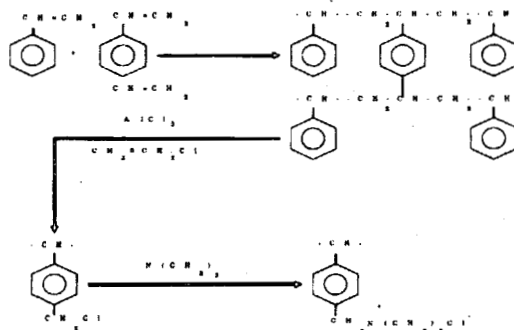


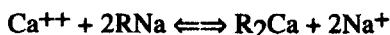
Fig. 4.1 Elaboración de la amberlita IRA-900. Se resalta la presencia de un nitrógeno cuaternario al final del proceso, que le confiere su carácter iónico.

## Intercambio iónico

Las resinas de intercambio iónico son fases sólidas que contienen grupos enlazados que portan cargas iónicas, que al combinarse con iones libres son capaces de sorberlos, liberando los que originalmente estaban unidos a los grupos iónicos.

La sorción se define (Vermeulen y col., 1986) como el contacto que se establece entre una fase fluida libre con una fase rígida y permanente, que tiene la propiedad de tomar y almacenar en forma selectiva una o más especies de solutos contenidos originalmente en el fluido.

El intercambio iónico es una reacción reversible entre cantidades equivalentes de especies químicas. Como un ejemplo del intercambio catiónico, se tiene la reacción para suavizar el agua (Vermeulen y col., 1986):



Donde R representa un sitio aniónico univalente y estacionario en la matriz de la resina.

De acuerdo a la ley de acción de masas, se puede llegar a la siguiente ecuación:

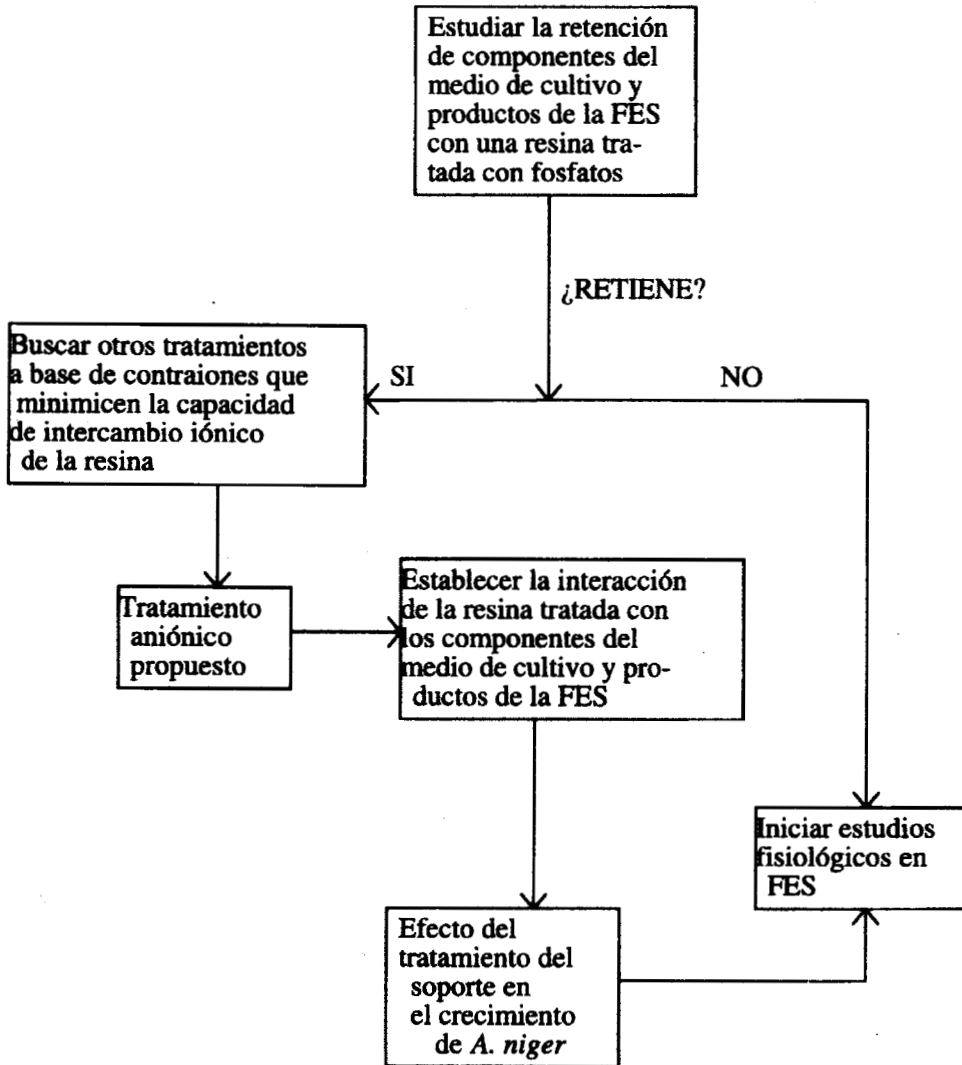
$$K_C = \frac{[\text{R}_2\text{Ca}] [\text{Na}^+]^2}{[\text{RNa}]^2 [\text{Ca}^{++}]}$$

En vista de que  $K_C$  no permanece constante conforme varía la concentración de iones, no puede ser llamado constante de equilibrio. A este valor se le denomina coeficiente de selectividad y es una medida de la afinidad de la resina por los iones (Benezra, 1967)

Las velocidades con que ocurren las reacciones de intercambio iónico pueden variar considerablemente dependiendo de la especie iónica. Por ejemplo, para una resina de intercambio catiónico, un catión inorgánico simple alcanza el equilibrio en minutos; en cambio, para un catión orgánico complejo le puede llevar horas (Benezra, 1967).

El objetivo general del presente capítulo consistió en someter a la resina a un tratamiento que minimice su capacidad intercambiadora; de tal manera que al adicionarle las sales del medio de cultivo, no las retenga, pues en ese caso se modificaría la composición del medio, y en consecuencia se podría afectar el crecimiento del hongo.

Para lograr este objetivo se adoptó la siguiente estrategia:



## 4.1 TRATAMIENTO DE LA AMBERLITA IRA-900

Algunos de los resultados más relevantes se localizan en este subcapítulo; sin embargo, los detalles de otros experimentos que contribuyeron al entendimiento del intercambio iónico pueden ser ubicados en el anexo A.

### 4.1.1 Tratamiento con fosfatos

En esta fase de la experimentación, se consideró como marco de referencia el tratamiento con fosfatos reportado por Auria y col. (1990). Estos investigadores proponen el uso de un soporte modelo, la amberlita IRA-900 y concluyen que es inerte una vez que se le aplica un tratamiento con un buffer de fosfatos.

Sin embargo, para continuar con las fermentaciones en estado sólido era necesario corroborar que el soporte fuera realmente inerte; ya que los resultados que pudieran surgir en las fermentaciones, deberían ser explicados por variables conocidas (concentración de sustratos y productos,  $A_w$ , T, pH, aireación, etc.). Además, la amberlita IRA-900 es una resina de intercambio iónico fuertemente básica a la que difícilmente se le puede minimizar su capacidad de intercambiadora con un anión de afinidad intermedia ( $H_2PO_4^-$ ) (Benezra, 1967).

En la Tabla 4.1 se observa que los aniones que componen el medio de cultivo fueron adsorbidos dependiendo de sus afinidades por la resina (Benezra, 1967). Cuando se adicionó  $Cl^-$  a la Rp, el 28 % fue intercambiado por fosfatos, esto sugiere que las afinidades de ambos aniones no fueron muy diferentes por los grupos amonio de la amberlita. Del  $H_2PO_4^-$  agregado, el 33 % fue adsorbido por la resina, mostrando la insaturación de la resina por este anión, lo cual concuerda con la capacidad de intercambio reportada por el fabricante (4.2 meq/gRS) (Rohm and Haas Co., 1984); ya que los miliequivalentes suministrados a la resina durante el tratamiento con fosfatos fueron de 2 meq/gRS (ver sección 3.8.1). En el caso del  $SO_4^{=}$  adicionado, se observa que todo el sulfato fue adsorbido por la resina, mostrando una gran afinidad por este anión, siendo capaz de desplazar a fosfatos y cloruros que estaban asociados a los grupos amonio de la resina.

Estos resultados descartan la posibilidad de emplear al ión fosfato en el tratamiento de la resina, debido a que se tendrían limitaciones nutricionales en una fermentación.

Tabla 4.1. Retención de aniones en la resina tratada con fosfatos (Rp).

agregados	retenidos	meq* de sal/gRS	
		en el sobrenadante	%
0.07 NaCl	0.02	0.05 NaCl 0.02 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	29
0.03 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.01	0.02 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.01 NaCl	33
0.03 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.03	0.00 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.02 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.01 NaCl	100

\*meq son los miliequivalentes. % es el porcentaje acumulación del anión en la resina. La Rp se mantuvo en contacto con una solución del ión 1 h a 35 °C y se analizó el sobrenadante por HPLC (ver sección 3.7.5).

#### 4.1.2 PROPUESTA DE UN TRATAMIENTO PARA LA RESINA

En vista de que los iones más afines a la resina (citrato y sulfato) no lograron abatir su capacidad intercambio iónico, y que un anión es sorbido independientemente de su afinidad, a condición que no se encuentre originalmente enlazado a los grupos iónicos de la resina (ver Anexo A.), la propuesta que surge es usar todos los iones que constituyen el medio de cultivo para el tratamiento de la resina.

En la figura 4.1a, se observa que los tratamientos 1, 2 y 3 aplicados a la resina (ver sección 3.8.2) no condujeron a diferencias apreciables con respecto al intercambio de aniones. El tratamiento 3 es el que correspondió a la menor concentración de sales empleadas y al mejor perfil de aniones en solución. De aquí se partió para la formulación del tratamiento t (ver sección 3.8.2), eliminando el NaCl (puesto que lo contiene la resina en su forma iónica original) y aumentando el (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

En la figura 4.1b, se observa que la resina no tratada (Rnt) adsorbió completamente al SO<sub>4</sub><sup>=</sup> y al 60% de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>; al mismo tiempo que libera una gran cantidad de Cl<sup>-</sup>. Mientras que, con la resina tratada se logró lo que se deseaba, obtener una resina que al mantenerla en contacto con el medio de cultivo no lo modifica drásticamente. Este tratamiento será el empleado en los experimentos sucesivos.

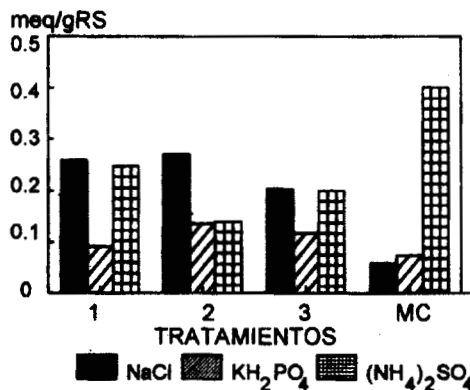


Fig. 4.1a Respuesta de los diferentes tratamientos de la resina en la sorción de los aniones del medio de cultivo(MC).

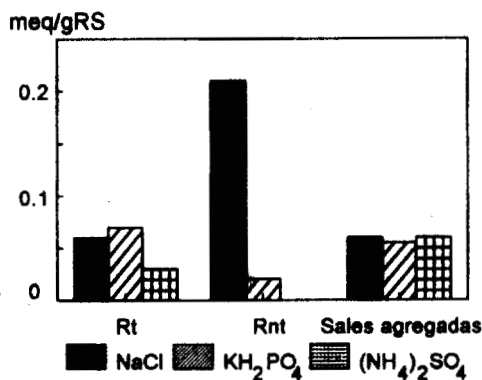


Fig.4.1b Comparación del tratamiento propuesto con la resina sin tratar. Rt es la resina tratada y Rnt es la resina no tratada

## 4.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO DEL SOPORTE EN EL CRECIMIENTO DE *Aspergillus niger*.

El objetivo que se persiguió en esta sección fue investigar si el tratamiento del soporte (Capítulo 4) estimula el crecimiento de *Aspergillus niger*. Para este objetivo, se propuso llevar a cabo un cultivo superficial con un medio expuesto a la resina y una FES.

Por otro lado, se llevaron a cabo cultivos superficiales a diferentes concentraciones de glucosa para dar una aproximación de las FES y comprobar la capacidad del hongo para crecer a elevadas concentraciones de glucosa.

### 4.2.1 Influencia indirecta del tratamiento del soporte en el crecimiento y consumo de sustrato de *A. niger* por cultivo superficial.

Se propuso un método indirecto de conocer la influencia que tiene el tratamiento aniónico del soporte en el crecimiento de *A. niger*, el cual consistió en comparar las cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato en caja Petri, entre un medio de cultivo no expuesto a la resina y dos medios expuestos a: i) la resina sin tratamiento alguno y ii) la resina tratada con el procedimiento antes planteado ( ver sección 3.8.2).

Partiendo de la hipótesis de que en un medio de cultivo (ver sección 3.3.1) con 50 g/l de glucosa y el resto de los componentes reducido a la mitad, las sales limitarán el crecimiento; al poner en contacto el medio con la resina no tratada y que conserva funcional su capacidad intercambiadora, retendrá aniones vitales para *A. niger* ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ ), reflejándose en un crecimiento escaso; en tanto que la resina tratada no interferirá con el crecimiento al no modificar substancialmente la constitución del medio.

El único medio (ver sección 3.5.6) que requirió ajuste de pH fue el expuesto a la resina no tratada, después de la exposición aumentó su pH a 6.8 y se ajustó a 4.95 con HCl. Esta variación del pH ocurrió por el secuestro de iones fosfatos por parte de la resina, ya que estos iones son los que confieren al medio su capacidad amortiguadora. Esto se corroboró del análisis por HPLC (Fig. 4.2), donde se observa que las concentraciones de fosfatos y sulfatos después de exponer el medio en la resina no tratada (Rnt) alcanzaron niveles bajos, el 70 % del fosfato y el 85% del sulfato se intercambiaron por cloruros de la resina. Particularizando en la resina tratada (Rt) (Fig. 4.2), se aprecia que la concentración de fosfatos y sulfatos fueron teóricamente apropiadas para lograr un crecimiento balanceado.

Por otro lado, se verificó que la presencia de una concentración elevada de glucosa no modifica la retención de los aniones en la resina, ya que se diseñó un experimento que así lo demostró (datos no mostrados).

### Aniones (g/l)

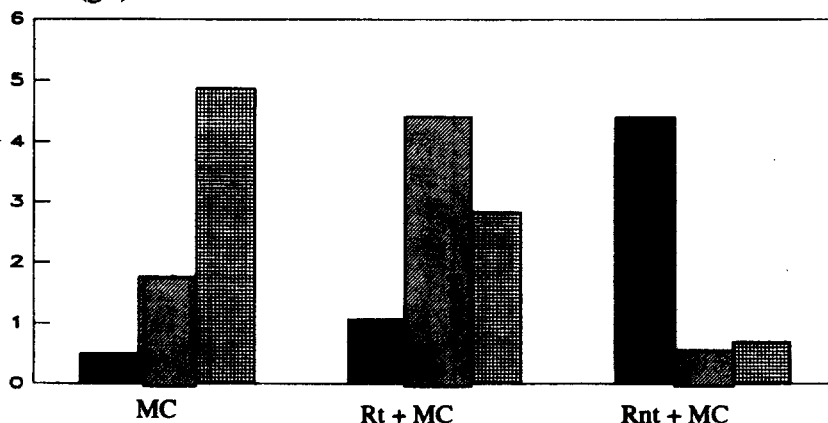


Fig. 4.2 Aniones que resultan de la exposición del medio de cultivo con resinas no tratada (Rnt) y tratada (Rt). MC es el medio de cultivo original.

■ Cloruros, ▨ fosfatos y ▩ sulfatos.

Los resultados en la Figura 4.3 muestran que no hubo diferencias en el crecimiento y consumo de sustrato con los tres tratamientos. Aunque la resina no tratada retuvo los aniones indispensables para el metabolismo celular; al parecer dejó en el medio de cultivo (Fig.4.2), la cantidad suficiente que garantizó un crecimiento balanceado; implicando que el medio de cultivo antes de la exposición a la resina, estaba excedido en sales, aún cuando se diluyó (1:2); esto significa que la composición en fósforo y azufre del medio de cultivo diseñado en la sección 3.3.1 esta excedido. Por lo tanto, para ver reflejado el efecto de la limitación por sales en el crecimiento, causada por su retención en la resina, se tendría que rediseñar otro medio que verdaderamente estuviera limitado en sales.

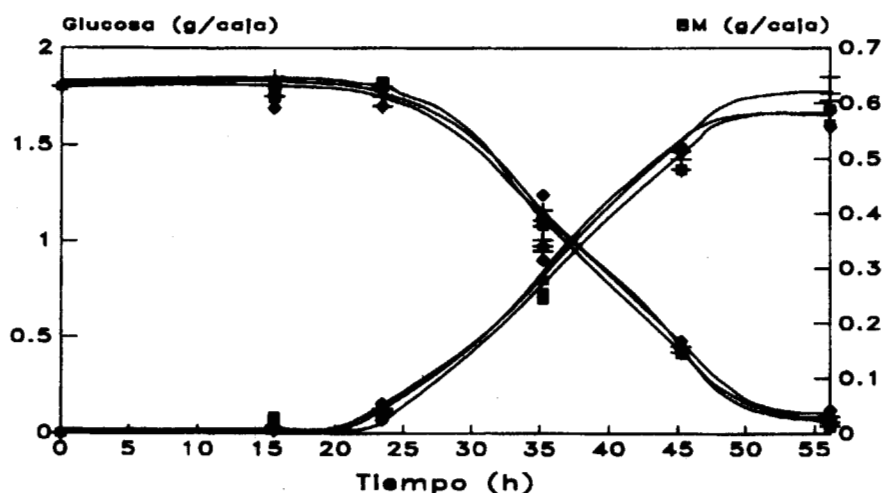


Fig. 4.3 Cinéticas de crecimiento y consumo de glucosa en medios de cultivo sujetos a diferentes tratamientos: (■) testigo, (+) expuesto a la resina tratada y (◆) expuesto a la resina no tratada.

#### 4.2.2 Importancia del tratamiento de la resina en FES

El método indirecto anterior no arrojó diferencias en los tratamientos de las resinas; sin embargo, se podría proponer como hipótesis que el contacto directo de la resina con el hongo en una FES, se lograrían diferencias en el consumo de sustrato imputables al tratamiento de la resina. Puesto que, por un lado se elevaría la relación de resina : medio de cultivo (1:1.5) y la resina no tratada tendería a intercambiar casi la totalidad de fosfatos y sulfatos del medio por cloruros; y por otro lado al adsorber los fosfatos, aumentaría el pH, lo que afectaría el metabolismo celular.

En la Figura 4.4 se muestran dos cinéticas del consumo de glucosa y del comportamiento del pH con una resina sin tratamiento y otra tratada (ver sección 3.8.2); en donde, en la FES con la resina no tratada, el pH inició muy alto (por la adsorción de iones fosfatos); sin embargo, al finalizar la fermentación se presentó una caída del pH hasta 2.5, que coincide con la caída de la fermentación con la resina tratada.

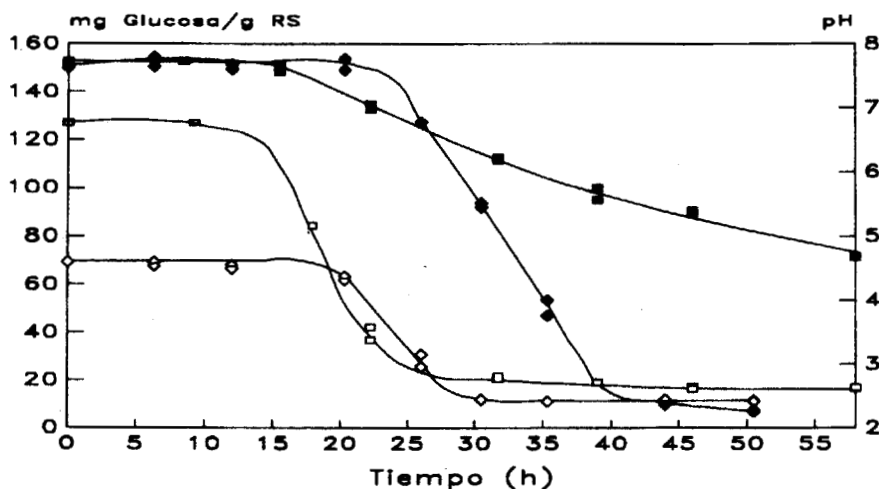


Fig. 4.4. Cinética en el consumo de glucosa y comportamiento del pH en dos FES con 100 g/l de glucosa, teniendo como soporte una resina no tratada: (■) glucosa y (◻) pH) y una resina tratada: (◆) glucosa y (◊) pH).

Con respecto al consumo de glucosa para la FES con la resina tratada (Fig. 4.4), éste se llevó a cabo en aproximadamente 40h, en un crecimiento sin limitaciones de fosfato ni sulfato (Fig. 4.5); en tanto en el caso de la resina no tratada, se observa que probablemente el sustrato se consumió a una velocidad limitada por la difusión de aniones, ya que el análisis por HPLC (Fig. 4.5) mostró que el fosfato y el sulfato, se encontraban en concentraciones fuera del límite de detección (aún cuando se haya analizado la muestra con un mínimo de dilución), detectando solamente cloruros en el medio absorbido por la resina, lo que sugirió que el equilibrio que se establece entre los aniones unidos a la resina y los libres en solución, fue roto por la presencia del hongo. Esto es, a medida que se liberaron los aniones, fueron consumidos por el hongo, evitando su cuantificación en solución, siendo probablemente la disponibilidad de estos nutrientes la que limitó el consumo de glucosa y por consecuencia del crecimiento.

De las comparaciones de las dos FES, se justificó la necesidad del tratamiento para el soporte, puesto que garantizó el abastecimiento de aniones vitales para el

metabolismo microbiano y el inicio del cultivo a un pH adecuado para el crecimiento para *A. niger*.

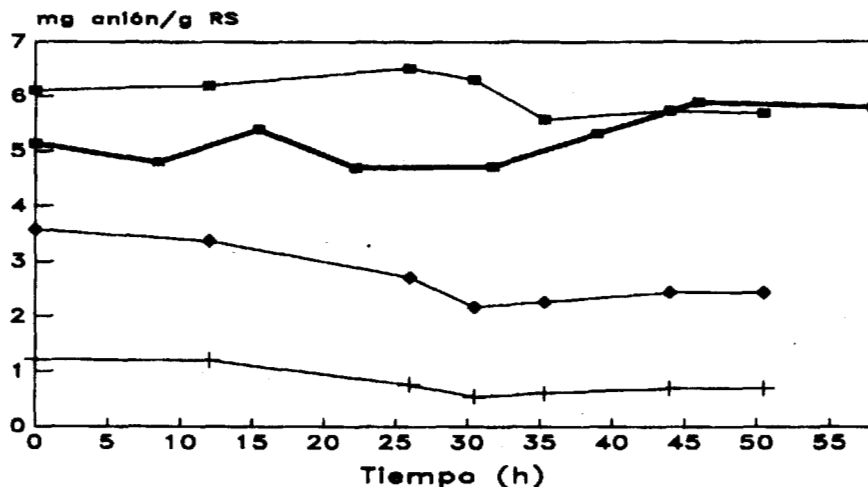


Fig. 4.5 Aniones del medio de cultivo en el curso de la FES. Las líneas delgadas corresponden a la FES con la resina tratada y la gruesa a la FES con la resina no tratada, donde únicamente se detectó la presencia de cloruros. (■) cloruro, (◆) fosfato y (+) sulfato.

#### 4.2.3 Crecimiento de *Aspergillus niger* en diferentes concentraciones de glucosa

Este experimento se propuso para investigar si *A. niger* es capaz de crecer a elevadas concentraciones de glucosa y para que indique una aproximación de lo que ocurriría en una FES. Puesto que el planteamiento del proyecto de tesis se apoya en la hipótesis de que a grandes concentraciones de glucosa en un sistema de FES tiene lugar una desviación en el metabolismo.

En la Figura 4.6, se presenta la producción de biomasa y el consumo de glucosa por caja Petri con respecto a la concentración inicial de glucosa a la cual fue cultivado *A. niger* durante cinco días de incubación (ver sección 3.5.5). Se observó un aumento en la producción de biomasa y en el consumo de sustrato conforme la concentración de glucosa aumentó, llegando a un máximo a 150 y 200 g/l, para la producción de biomasa y el consumo de glucosa, respectivamente; para posteriormente observar una tendencia a declinar.

A medida que aumenta la concentración inicial de glucosa (Fig. 4.6), se observa

una tendencia a la disminución en el rendimiento de la biomasa producida con respecto a la glucosa consumida ( $Y_{x/s}$  de 0.4 para 20 g/l de glucosa inicial a 0.2 para 400 g/l), lo cual sugiere una desviación en el metabolismo. La desviación en las rutas metabólicas puede darse por la inhibición o represión catabólica directa de la glucosa sobre las enzimas; es decir que las elevadas concentraciones de glucosa puede llegar a bloquear una ruta que en condiciones de concentración de glucosa baja funciona armónicamente, activando el funcionamiento de otra como una alternativa para continuar su crecimiento. O bien, la concentración elevada de glucosa puede actuar indirectamente, al disminuir la  $A_w$  intracelular y modificar el funcionamiento de enzimas e influir en la producción de solutos compatibles (Brown, 1978), tales como los polioles (Luard, 1982a, 1982b, 1982c; Beever y Laracy, 1986; Brown, 1978; Adler y col., 1982) que a su vez actúan como moduladores de algunas actividades enzimáticas (por ejemplo la ICDH, en 2.4.2) y son capaces de desviar el flujo metabólico.

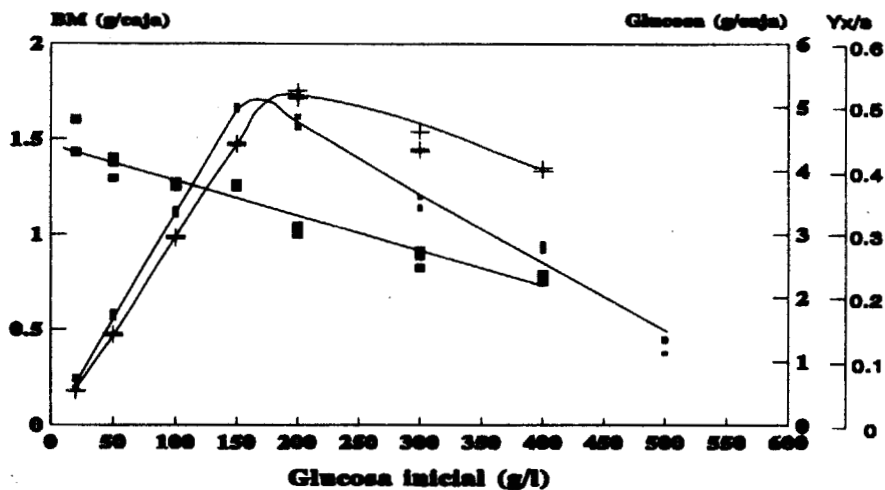


Fig. 4.6. Crecimiento, consumo de sustrato y  $Y_{x/s}$  para *Aspergillus niger* cultivado en diferentes concentraciones de glucosa al cabo de 5 días de incubación. BM es la biomasa producida en la caja Petri (+), la glucosa se refiere a la cantidad de glucosa consumida por caja Petri (■) y  $Y_{x/s}$  es el rendimiento de la biomasa producida en relación al sustrato consumido (■). Incubación a 32 °C durante 5 días.

Conviene señalar, que el medio de cultivo se diseñó para tener como sustrato limitante del crecimiento al nitrógeno (ver sección 3.3.1). Sin embargo, este experimento mostró que la concentración final de biomasa fue limitada por la concentración inicial de glucosa, encontrando un máximo en la biomasa producida a 150 g de glucosa/l. Si se supusiera que todo el N del medio de cultivo fue incorporado a la biomasa, entonces se obtendría que la biomasa proveniente de un cultivo superficial

(a 150 g de glucosa/l) contiene tan sólo un 2.5% de N, lo que la ubica en un nivel inferior a la reportado para biomazas fúngicas (de 4 a 7%) (Scragg, 1988), a menos que el hongo hubiera sido capaz de degradar la estructura del agar y consumir su N.

Cabe añadir, que a partir de los cultivos superficiales con 200 g/l de glucosa, se detectó la presencia de ácido cítrico con el método reportado por Marier y Boulet (1957) (ver sección 3.7.1), sugiriendo que la desviación en el metabolismo origina la síntesis del ácido.

### 4.3 CONCLUSIONES

El tratamiento con fosfatos no evitó la adsorción de sulfatos y fosfatos, por consecuencia, se descartó su empleo el tratamiento de la resina, debido a que se tendrían limitaciones nutricionales en una fermentación.

El tratamiento propuesto, fue aquel que contiene los aniones que constituyen el medio de cultivo en su conjunto. Este tratamiento evitó la modificación drástica del medio de cultivo que se absorbió en la resina; en tanto que sin el tratamiento, la resina absorbió todo el sulfato y una gran parte del fosfato (60%), liberando una elevada cantidad de cloruros.

La composición en aniones del medio de cultivo diseñado estuvo excedido y no permitió ver diferencias en el crecimiento del hongo con un cultivo superficial donde el sulfato y fosfato fueron reducidos al 15 y 30%, respectivamente.

El tratamiento aniónico al cual se sometió la resina, se justificó al comparar el comportamiento que *A. niger* mostró en las FES con resina no tratada y resina tratada. En el caso de una resina sin tratamiento, el consumo de glucosa fue limitado por la disponibilidad de aniones en solución y el pH al que inició la FES fue muy alto e inadecuado para que el crecimiento se llevara a cabo. Por el contrario, en una FES con resina tratada, el consumo de glucosa procedió rápidamente y el pH al que inició el cultivo (4.5) fue apropiado para el crecimiento de *A. niger*.

*Aspergillus niger* No. 10 fue capaz de crecer en cultivo superficial en un rango de concentraciones de glucosa desde 20 a 500 g/l, disminuyendo el rendimiento de producción de biomasa en relación al sustrato consumido ( $Y_{x/s}$ ) desde 0.4 a 0.2 para la concentración inicial de glucosa de 20 y 400 g/l, respectivamente.

Se tuvieron indicios de que esta disminución en el  $Y_{x/s}$ , se debió en parte a una desviación en el metabolismo hacia la síntesis de ácido cítrico.

**PARAMETROS CINETICOS  
Y BALANCES DE MATERIA  
Y ENERGIA**

## 5 PARAMETROS CINETICOS Y BALANCES DE MATERIA Y ENERGIA.

### 5.1 PARAMETROS CINETICOS

En la actualidad, una gran variedad de productos biotecnológicos se obtienen a partir de procesos fermentativos. Estos procesos pueden ser controlados y optimizados mediante el conocimiento de los patrones de crecimiento, consumo de sustrato y formación de producto para cada microorganismo. La determinación de parámetros cinéticos y rendimientos ofrece una valiosa información descriptiva de un proceso biológico y representa la eficiencia de conversión de un sustrato a un producto. La medición de parámetros cinéticos ha recibido poca atención y su carencia se patentiza aún más en el caso de la FES, donde existen dificultades adicionales inherentes a la heterogeneidad del sistema que entorpecen el análisis de la fermentación. Los parámetros cinéticos se calculan a partir del análisis de las variaciones con respecto al tiempo en los perfiles de las concentraciones de sustratos y productos.

En el presente capítulo se estudió el efecto de la concentración de glucosa sobre los parámetros cinéticos en FES, con un medio de cultivo limitado en nitrógeno. La limitación de N se consideró para que al aumentar la concentración de glucosa inicial, se mantuviera constante la concentración de biomasa máxima en cada fermentación y de esa manera provocar una desviación en el metabolismo.

Las concentraciones de glucosa estudiadas fueron: 50, 100, 200, 300 y 400 g de glucosa/l. Se proyectó llegar hasta esa concentración de glucosa para aprovechar la virtud del cultivo sólido de poderse emplear concentraciones más elevadas que en la FSm, y obtener productos más concentrados (posiblemente en menos tiempo de fermentación).

#### 5.1.1 Etapas del crecimiento

##### Fase de adaptación

Las fases de adaptación (lag) de *Aspergillus niger* no fueron afectadas por la concentración inicial de glucosa (Tabla 5.1), sugiriendo que no tiene una influencia negativa a nivel del tiempo de germinación y que al parecer, no requiere un tiempo adicional para adaptarse a las condiciones osmóticas que imperan en su entorno. Frecuentemente, la fase de adaptación refleja los efectos que el medio ambiente ejerce sobre el microorganismo. En estas FES, la disminución de la actividad de agua inicial

(Tabla 5.1) de 0.954 a 0.907 no parecen afectar el tiempo de inicio del crecimiento. Estos resultados son contrarios a los reportados por Oriol y col. (1988) empleando la misma cepa, con bagazo de caña como soporte y medio de cultivo sin oligoelementos. Estos investigadores sugirieron que la fase de adaptación aumentó como consecuencia de la elevación en la concentración de glucosa inicial (disminución de la  $A_w$ ). En las fermentaciones presentadas en la Figura 5.1, las fases de adaptación fueron prolongadas comparadas con los trabajos de Oriol y col. (1988) y de Auria y col. (1990), pero coinciden con las fases de adaptación encontradas en cultivos superficiales de los experimentos antes presentados (ver sección 4.2.1).

### **Fase de crecimiento exponencial**

En la Figura 5.1 se muestran las cinéticas de crecimiento para las fermentaciones, en ellas puede apreciarse que los perfiles en las fases de crecimiento exponencial fueron similares, lo que indica que la concentración inicial de glucosa ( $A_w$  de 0.954 a 0.907) sólo las afecta ligeramente.

Las concentraciones de las biomasa máximas de las FES (Tabla 5.1) fueron similares, probablemente por la limitación de nitrógeno en el medio (ver sección 5.2). Sin embargo, se debe tener presente otro fenómeno reportado por Laukevics y col. (1985), el cual involucra aspectos relacionados con limitaciones en el crecimiento fúngico debido a la disposición geométrica de las partículas en la FES. El espacio interpartícula es el que permite el crecimiento y es el que da origen a una limitación por el espacio disponible. Laukevics y col. (1985) han encontrado teóricamente que en FES, un hongo puede ocupar del 10 al 15% del espacio disponible.

Conviene señalar que otro factor relevante que pudo detener el crecimiento es el pH (Fig. 5.2), puesto que exhibe el mismo perfil de la curva de crecimiento, pero en sentido inverso, y en el momento en que llega a su nivel más bajo, el crecimiento se detiene (Fig. 5.1). Los resultados que apoyan esta hipótesis, son los aportados por Legiša y Kidrik (1989), quienes correlacionan la disminución del pH externo con el intracelular y consideran la influencia del pH en la velocidad metabólica, al afectar la actividad de varias enzimas.

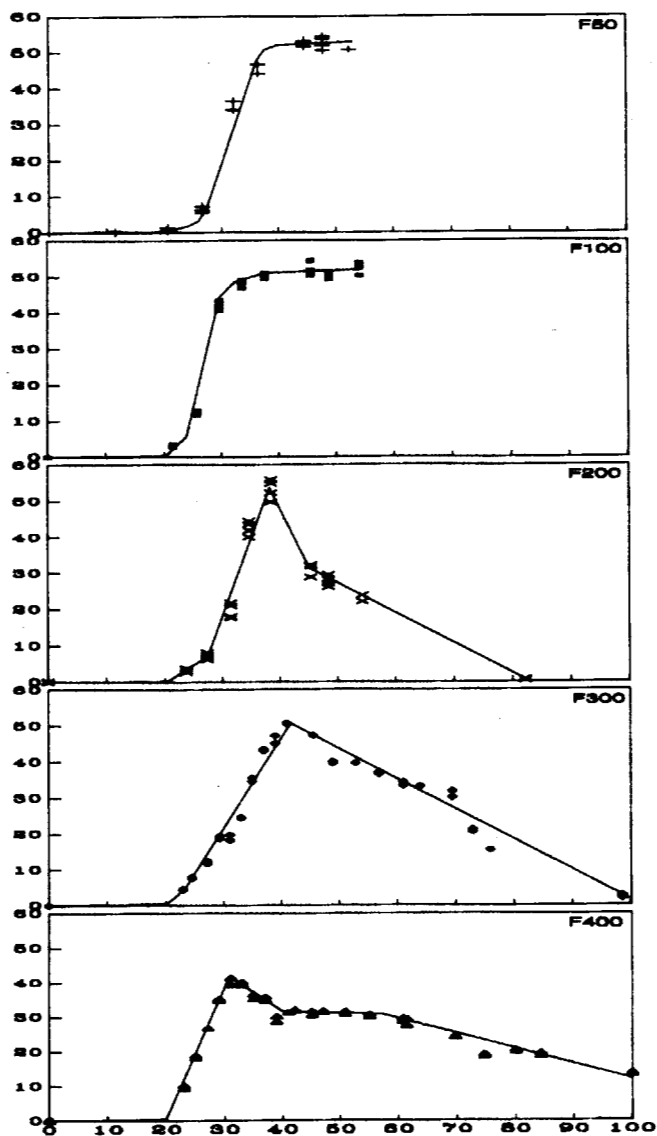


Fig. 5.1. Cinéticas de crecimiento para las FES.

Tabla 5.1 Características principales de las FES a diferentes concentraciones iniciales de glucosa. F50, F100, F200, F300 Y F400 son las FES a 50, 100, 200, 300 Y 400 g/l de glucosa, respectivamente. Los sustratos y productos están expresados en mg /gRS.

	F50	F100	F200	F300	F400
tiempo (h)	52	54	82	99	100
Fase de adaptación (h)	23	22	22	22	21
So	75.3	142.7	289.1	439.7	588.3
Humedad inicial (%)	58.1	55.7	51.9	46.6	43
Aw inicial	0.954	0.941	0.928	0.918	0.907
Sf	3	8	5	110	282
BMmáxima	53	54	54	50.5	40.5
Cítrico	4.6	5	64.5	72	93
Eritrol	2.4	2.6	0	25	28.5
Glicerol	0	0	0	7.2	9

Nomenclatura: BM, biomasa; So, glucosa inicial; Sf, Glucosa final; Aw, es la Actividad de agua

Nota: El tiempo se refiere, al tiempo en que el consumo de glucosa se detiene. Las concentraciones de cítrico, eritrol y glicerol corresponden al término de la fermentación.

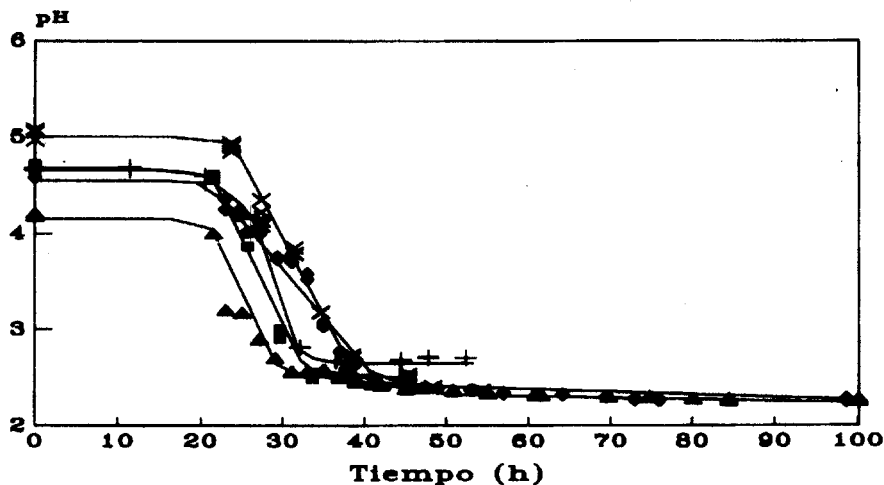


Fig. 5.2 Comportamiento del pH en las FES. (+) F50, (■) F100, (X) F200, (◆) F300, (▲) F400.

## Esporulación

En la Figura 5.1 se observa que en la F200, F300 y F400, la biomasa alcanzó un máximo para luego declinar. Esta disminución aparente de la biomasa, se atribuyó a que el método para estimarla (método del colorante ligado a la proteína) no fue aplicable cuando la morfología del hongo cambió de micelio a espora, puesto que las condiciones de hidrólisis aplicadas (ver sección 3.9.1) fueron muy suaves y por consecuencia selectivas para liberar exclusivamente la proteína del micelio. Esto se verifica en la Figura 5.3, donde a medida que la estimación de la biomasa micelial disminuyó (Fig. 5.1), la esporulación aumentó, alcanzándose una concentración máxima de  $1.4 \cdot 10^9$  esporas/gRS para la F300. Larroche y Gros (1992) reportaron que la proteína micelial se transloca a la espora durante la esporogénesis, este resultado apoya lo discutido anteriormente.

Gervais y col. (1988) encontraron que la  $A_w$  (empleando glicerol como depresor) en cultivo superficial se relaciona con el crecimiento micelial y la esporulación, siendo el valor óptimo en  $A_w$  para la esporulación ligeramente inferior que el óptimo para el crecimiento; en *Trichoderma viride* son de 0.99 y 0.98, respectivamente y en *Penicillium roquefortii* son de 0.97 y 0.96. En este trabajo, la máxima esporulación con *A. niger* se logró obtener a la  $A_w$  de 0.95 (al tiempo de inicio de la esporulación) (Fig. 5.4), con glucosa como depresor de la  $A_w$ . Esta elevada esporulación en F300 es interesante si se considera su aplicabilidad. Actualmente, la inducción de la esporulación ha tomado gran importancia (Larroche y Gros, 1992) debido: i) al empleo de esporas como biocatalizadores en reacciones bioquímicas, ya que muestran una alta actividad catalítica y ii) a que las esporas son uno de los principales inconvenientes que tiene la FES en su aplicación en los procesos a gran escala, ya que precisa de una gran cantidad de esporas en la inoculación. Además, el uso comercial de las esporas (Broderick y Greenshields, 1982) tiene varias ventajas sobre los otros sistemas microbianos por su mayor especificidad y eficiencia de la reacción, recuperación sencilla del producto, larga vida de almacenaje y uso repetido del mismo lote de esporas.

153905

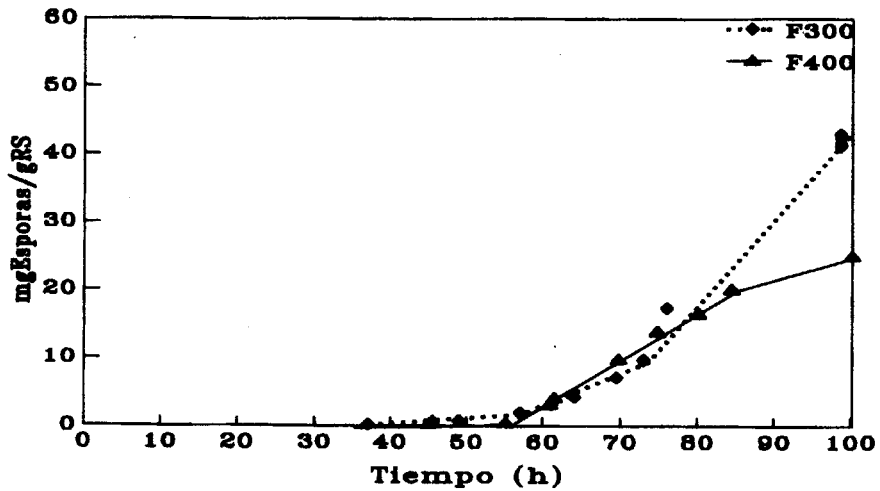


Fig. 5.3 Cinéticas de la esporulación para la F300 y F400.

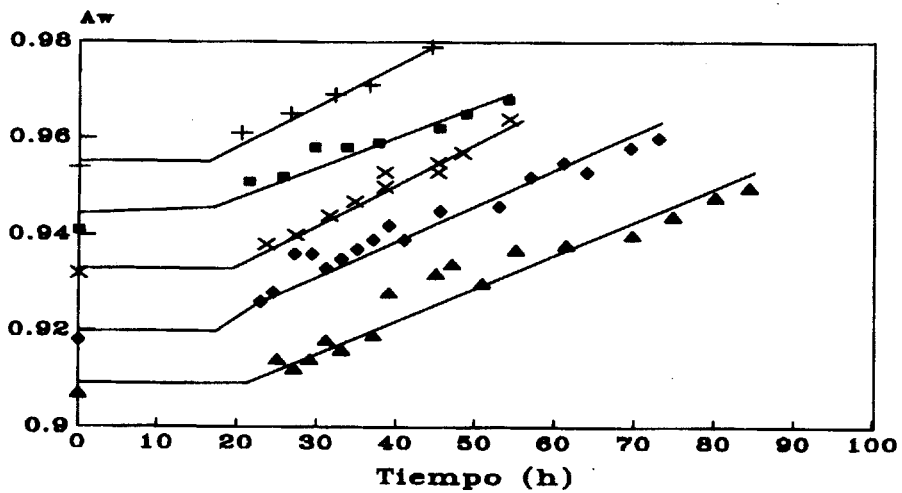


Fig. 5.4.  $A_w$  en el curso de las FES. (+) F50, (■) F100, (X) F200, (◆) F300, (▲) F400

### 5.1.2 Velocidad específica de crecimiento

Uno de los principales problemas analíticos que se enfrentan en el cálculo de la constante de saturación ( $K_s$ ), es el manejo de concentraciones de sustrato y biomasa muy diluidas. El valor de  $K_s$  reportado para *A. niger* en cultivo sumergido (FSM) es de  $5 \cdot 10^{-3}$  g de glucosa/l (Marison, 1988a). Este valor no necesariamente tiene que parecerse al que pudiera obtenerse en FES, pero podría sugerir una aproximación.

En este trabajo,  $K_s$  no pudo ser calculada porque las concentraciones de glucosa estudiadas fueron elevadas, sin lograr establecer una relación tipo Monod para la  $\mu$  en función de la concentración de glucosa (Fig. 5.5).

En la Figura 5.5, se presentan las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu = 1/X \cdot dX/dt$ ) para las FES, las cuales fueron calculadas al graficar los logaritmos de la biomasa vs tiempo. Los datos (no mostrados) se comportaron linealmente de las 22 a las 30 h y es justamente en ese intervalo de tiempo donde se calculó  $\mu$ , considerando un promedio de 10 puntos en cada FES para realizar la regresión y un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.98.

Por otra parte, se tienen reportes que si la concentración inicial de sustrato toma un valor considerablemente alto (por ejemplo, 10 a 20 veces el  $K_s$ ) (Marison, 1988a),  $\mu$  puede empezar a declinar como resultado de una inhibición por sustrato. El comportamiento mostrado por  $\mu$  (Fig.5.3), sugiere una inhibición por sustrato, ya que el modelo que considera tal inhibición (Pirt, 1975b) puede aplicarse adecuadamente a los datos:

$$\mu = (\mu_{\max} S K_i) / (S K_i + K_s K_i + S^2) \quad \text{Ec. 5.1}$$

Si se asume que  $K_s$  es mucho menor que los valores que puede adquirir el sustrato, la ecuación 5.1, puede simplificarse a:

$$1/\mu = 1/\mu_{\max} + S/(\mu_{\max} K_i) \quad \text{Ec. 5.2}$$

Los parámetros cinéticos provenientes de la ecuación 5.2 fueron  $\mu_{\max}$  de  $0.426 \text{ h}^{-1}$  y  $K_i$  (constante de disociación del complejo  $XS^2$ ) de  $259.1$  g de glucosa/l, con un  $R^2$  de 0.998. Mientras que  $\mu_{\max}$  tuvo un valor teóricamente aceptable, el valor de  $K_i$  fue alto, esto significó que el equilibrio ( $XS + S \rightleftharpoons XS^2$ ) estuvo desplazado hacia el complejo  $XS + S$ , lo cual implicó una baja inhibición en la FES. Lo anterior pudo constatarse al observar los valores de  $\mu$  que disminuyeron ligeramente de 0.35 a 0.2, desde una concentración de glucosa de 50 a 400 g/l (Fig.5.5).

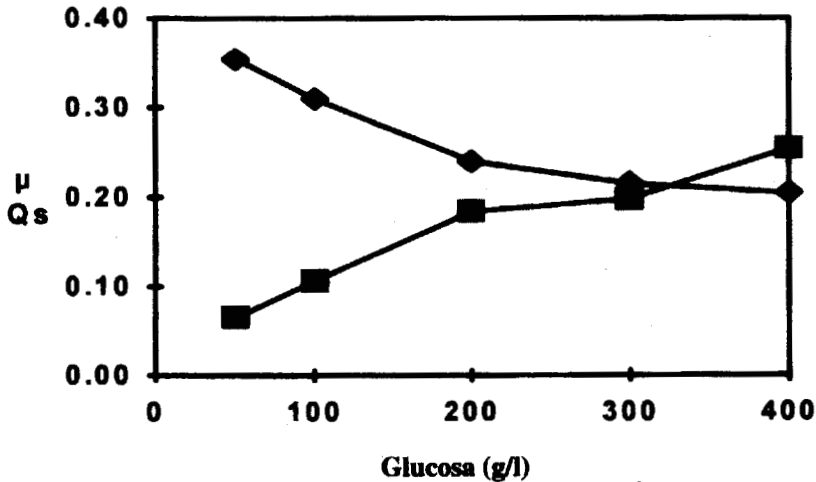


Figura 5.5. (◆) velocidad específica de crecimiento ( $\mu$  en  $h^{-1}$ ) y (■) velocidad específica de consumo de glucosa ( $Q_s$  en  $gGlucosa/(gBiomasa+h)$ ) con respecto a la concentración inicial de glucosa (g/l).

El efecto inhibitorio de la glucosa podría ser indirecto debido al abatimiento de la  $A_w$ . Los mecanismos que el hongo posee para hacer frente a la baja  $A_w$  son por un lado, la disminución del volumen celular (Beever y Laracy, 1986; Gervais y col., 1988) y por el otro, la síntesis de osmorreguladores como los polioles (Blomberg y Adler, 1992), es claro que ambos mecanismos inhiben el crecimiento.

Los polioles son considerados como solutos compatibles (Brown, 1978) que causan efectos negativos mínimos sobre las enzimas y les brindan un efecto protector al estabilizar sus estructuras cuaternarias. Sin embargo, pueden provocar desviaciones en las rutas metabólicas, de una pentosa fosfato (HMP) que prevalece en las primeras etapas del cultivo a una glucólisis (EMP) dominante hacia las etapas finales del crecimiento (Legiša y Matthey, 1988). Como bien se conoce, la HMP es una ruta que tiene una alta producción de NADPH+H empleado en la biosíntesis de materiales celulares y es más eficiente que la EMP desde el punto de vista de la conservación de la energía del sustrato en materiales celulares, lo que probablemente incide en una disminución de  $\mu$  al cambiar de HMP a EMP.

La respuesta fisiológica del microorganismo al disminuir su velocidad de crecimiento puede ser considerada como una inhibición; sin embargo a nivel molecular, no es claramente distinguible entre una inhibición o una represión enzimática, consecuencia de una elevada concentración de sustrato. Se cuentan con evidencias en

FSm (Marison, 1988a), que algunas enzimas involucradas en la respiración son reprimidas catabólicamente cuando la concentración de azúcares es alta, aún cuando la concentración de oxígeno no sea limitante (efecto Crabtree).

### 5.1.3 Velocidad específica de consumo de sustrato

Contrario al comportamiento de  $\mu$ , la velocidad específica de consumo de glucosa ( $Q_s=1/x*ds/dt$ ) aumentó con la concentración de glucosa inicial (Fig. 5.5). Este fenómeno podría ser consecuencia de un aumento en la velocidad de transporte en la membrana por una modificación en su composición (Hosono, 1992), que implica cambios en su permeabilidad. La investigación de Brandao y Loureiro-Dias (1990) muestra que la velocidad de transporte de glucosa aumenta cuando se incrementa su concentración, gracias al funcionamiento de un sistema de transporte por difusión facilitada.

El periodo de tiempo en que el consumo de glucosa fue lineal aumentó conforme se incrementó la concentración de glucosa inicial (Fig. 5.6). Este consumo de glucosa fue el resultado de su distribución en la biomasa, el producto y el mantenimiento.

Se debe mencionar que el consumo de glucosa no fue total a partir de la F300 (Fig.5.6) lo que sugirió una inhibición por producto. El responsable de esta inhibición parecería ser el citrato, el cual alcanza concentraciones elevadas de hasta 127 mg/gRS (Fig. 5.8) y está demostrado su papel inhibitorio sobre la enzima clave del funcionamiento de la glucólisis, la 6 fosfofructocinasa (Voet y Voet, 1990a); recordando que dicha ruta es la que sustenta la actividad metabólica durante la producción de ácido cítrico (Legiša y Matthey, 1988). Otra enzima que el citrato puede inhibir y con ello detener su propia síntesis, es la citrato sintasa.

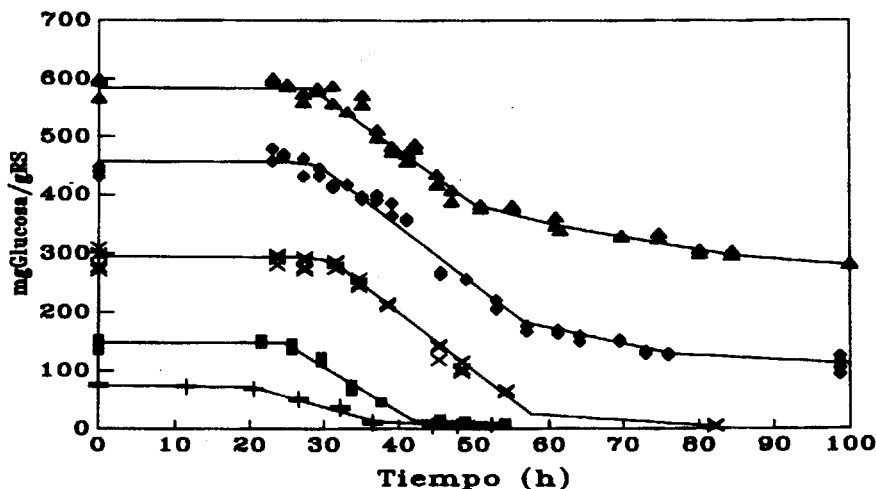


Fig. 5.6 Consumo de glucosa en el transcurso de las FES. (+) F50, (■) F100, (X) F200, (◆) F300, (▲) F400.

#### 5.1.4 Velocidades específicas de formación de producto

En la Figura 5.7, puede observarse cómo las velocidades específicas de formación de productos ( $Q_p=1/x \cdot dp/dt$ ) (ácido cítrico, eritrol y glicerol) aumentaron con el incremento de la concentración inicial de glucosa a excepción de la F400 en la que decayó ligeramente. La  $Q_{\text{cítrico}}$  máxima se logró obtener en F300, siendo en esa fermentación que también se logró obtener un máximo en la concentración de ácido cítrico (Fig. 5.8), el rendimiento y la productividad. En la Tabla 5.2 puede observarse que la producción y productividad en este trabajo fueron superiores a las reportadas en cultivo sumergido, con las repercusiones que pudiera representar a nivel de su aplicación.

La máxima producción de ácido cítrico obtenida en la F300, coincide con el máximo en la esporulación (Fig. 5.1), lo que sugiere que la elevada velocidad anabólica se logró en parte por las esporas. Esto podría explicar la disminución en la producción de ácido cítrico en la F400, donde se tiene una menor esporulación.

Tabla 5.2 Comparación entre la producción (Fig. 5.8), productividad y rendimiento máximos en ácido cítrico de este trabajo con otras investigaciones en cultivo sumergido.

Producción de ác. cítrico	Productividad	Rendimiento	Referencia
50 g/l	0.4 g/(l*h)	0.57 g/g	a
30 g/l	0.135 g/(l*h)	0.55 g/g	b
60 g/l	0.31 g/(l*h)	0.57 g/g	c
85 g/l	1.21 g/(l*h)	0.385 (g/g)	Este trabajo

a) Kubicek y Röhr (1985) con *A. niger* a escala planta piloto, b) Lee y col. (1989) con *A. niger* inmovilizado en espuma de poliuretano y c) Kirimura y col. (1992) con cepas mutantes productoras de ácido cítrico de *A. niger*

A concentraciones elevadas de sustrato, las velocidades de formación de productos y consumo de sustratos de las FES son mayores que las encontradas en FSm. Esto podría ser atribuido a la difusión de nutrientes, donde posiblemente el sustrato esté menos concentrado a medida que difunde hacia el microorganismo. El consumo constante ocasiona que la glucosa no inhiba al hongo de la manera como lo hace en FSm; o bien, porque el sistema enzimático del microorganismo en la FES se encuentra desreprimido (Solis y col. 1993).

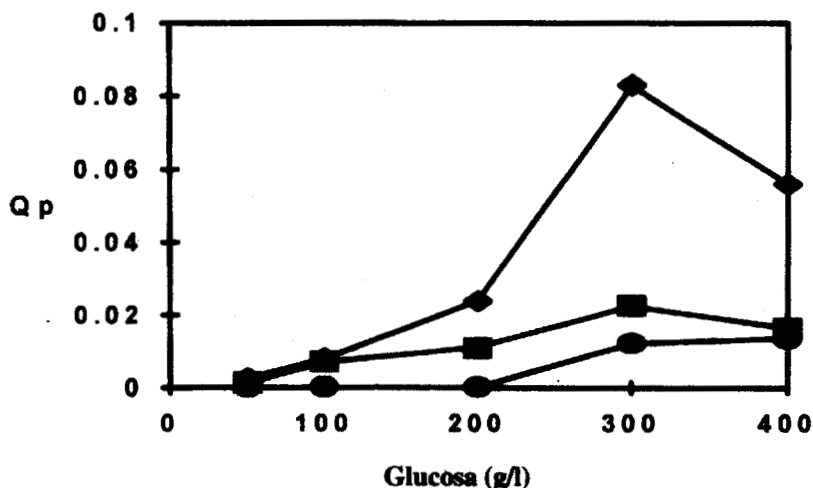


Fig. 5.7 Velocidades específicas de formación de productos ( $Q_p$ ) en función de la concentración de glucosa (g/l). (◆)  $Q_{p\text{cítrico}}$ , (■)  $Q_{p\text{queritrol}}$ , y (●)  $Q_{p\text{glicerol}}$  expresados en g de producto/(g de biomasa\*h).

Nota: La discusión de los polioles (eritrol y glicerol) se reserva para el próximo capítulo.

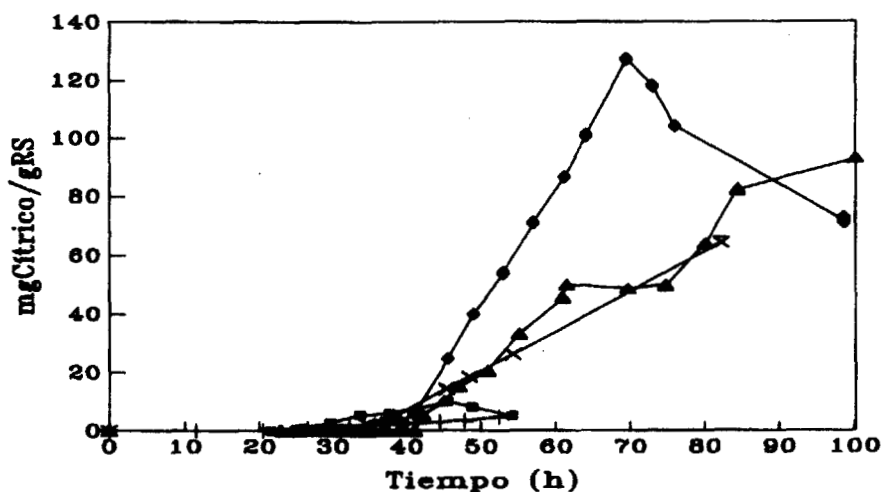


Fig. 5.8 Cinética de producción de ácido cítrico. (+) F50, (■) F100, (X) F200, (◆) F300, (▲) F400

### 5.1.5 Rendimientos

En la Figura 5.9 se muestran los rendimientos de producción de biomasa, ácido cítrico, eritrol y glicerol con respecto a la glucosa consumida. Estos resultados sugirieron una desviación en el metabolismo, en la que a concentraciones bajas de glucosa, *A. niger* consumió el sustrato para formar sus propias estructuras celulares; en tanto que a concentraciones elevadas, el hongo desvió su metabolismo hacia la síntesis de otros productos (principalmente ácido cítrico).

Para concluir esta sección conviene hacer una reflexión que consiste en el planteamiento de que los parámetros cinéticos no son realmente constantes; puesto que las condiciones ambientales cambian en todo momento y el microorganismo responde a esta influencia externa modificando su metabolismo y por lo tanto, sus velocidades de crecimiento, consumo de sustrato y formación de productos.

Las variaciones de los parámetros cinéticos pueden ser explicadas debido a que cuando el microorganismo crece, ocurren los siguientes eventos que afectan su metabolismo: i) el sustrato se consume y el potencial osmótico del medio aumenta, lo que implica que disminuye la concentración intracelular de osmorreguladores y aumenta

el turgor celular, y una ruta metabólica inhibida puede volver a ser funcional; también, pueden existir cambios en la composición de la membrana celular modificando el transporte de moléculas al interior y exterior de la célula. ii) la síntesis de algún producto puede inhibir enzimas y provocar desviaciones metabólicas. iii) si el pH no se controla, se modifica y causa inhibición enzimática; si se controla, disminuye el potencial osmótico al aumentar la concentración de sales y causa pérdida del turgor celular, aumento de osmorreguladores y modificación del metabolismo. iv) la densidad de empaque celular determina la continuidad en el crecimiento.

En los experimentos reportados en este trabajo ocurrieron cambios en la osmolaridad del medio como se mostró en la Figura 5.4, en donde la  $A_w$  aumentó en el curso de la fermentación. Además, tuvo lugar la síntesis de productos y la caída del pH, lo que sugirió que los parámetros cinéticos no son constantes en la historia del cultivo (por citar un ejemplo, véase la Figura 6.4a).

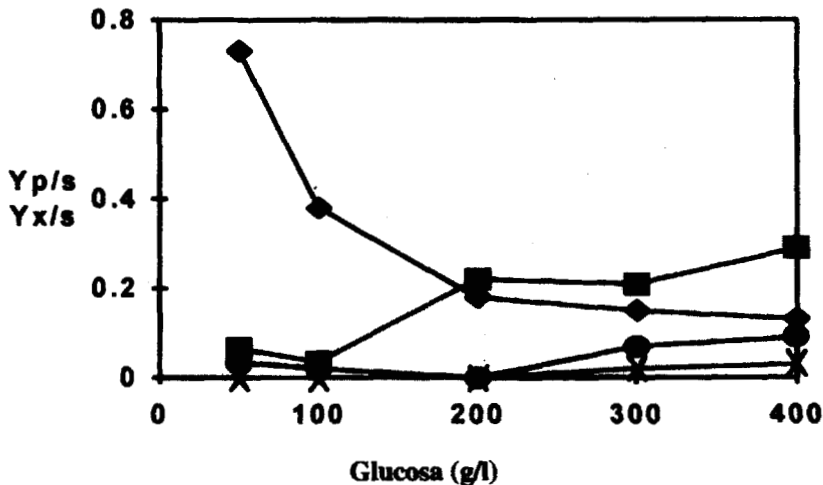


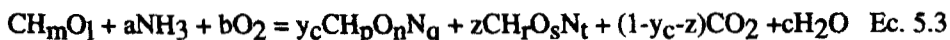
Fig. 5.9. Rendimientos de la formación de biomasa y productos con respecto al sustrato consumido ( $Y_x/s$ ,  $Y_p/s$ ) para el tiempo final de la fermentación. (◆) biomasa, (■) ácido cítrico, (●) eritrol y (X) glicerol.

## 5.2 BALANCES DE MATERIA Y ENERGIA

Los balances de materia y energía son ampliamente usados en biotecnología, principalmente para confirmar la consistencia y confiabilidad entre el consumo de sustratos y la síntesis de productos cuantificados experimentalmente. Para lograr un balance completo, es necesario medir la mayoría de las variables incluidas en un proceso biológico, como son los consumos de fuente de carbono, nitrógeno y oxígeno; y la producción de biomasa, producto(s) y  $\text{CO}_2$ .

Los balances de materia y energía propuestos por Erickson y col. (1978), se fundamentan en que el calor de reacción por electrón transferido al oxígeno por parte de una gran variedad de moléculas orgánicas, el número de electrones disponibles por átomo de carbono en la biomasa y la fracción en peso del carbono en la biomasa son relativamente constantes.

La ecuación del balance de materiales para el crecimiento microbiano (Erickson y col. 1978) se representa por:



donde  $\text{CH}_m\text{O}_l$  es la composición elemental del sustrato orgánico que se emplea como fuente de carbono y energía,  $\text{CH}_p\text{O}_n\text{N}_q$  es la composición elemental de la biomasa y  $\text{CH}_r\text{O}_s\text{N}_t$  es la composición elemental del producto.  $a$ ,  $b$ ,  $c$  y  $d(1-y_c-z)$ , son los moles de  $\text{NH}_3$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CO}_2$ , respectivamente, por átomo-gramo de carbono (at-gC) del sustrato orgánico.  $y_c$  y  $z$  son los rendimientos de carbono en la biomasa y carbono en el producto, respectivamente, en relación al carbono del sustrato consumido.

De un balance de materia y energía, se puede predecir que las necesidades del microorganismo por el oxígeno, se encuentran determinadas por los electrones que le serán transferidos. De un balance de los electrones disponibles para cada componente de la ecuación 5.3, se llega a:

$$\gamma_s + b(-4) = y_c\gamma_b + z\gamma_p \quad \text{Ec. 5.4}$$

donde  $\gamma_s$ ,  $\gamma_b$  y  $\gamma_p$  son los grados de reductancia del sustrato, biomasa y producto, respectivamente. El grado de reductancia se encuentra relacionado con el número de electrones disponibles que pueden ser transferidos al oxígeno.

Rearreglando la ecuación 5.4, se tiene que:

$$4b/\gamma_s + y_c\gamma_b/\gamma_s + z\gamma_p/\gamma_s = 1 \quad \text{Ec. 5.5}$$

donde el primer término representa a la fracción de electrones transferidos al oxígeno, el segundo ( $\eta = y_c \gamma_b / \gamma_s$ ) representa a la fracción de electrones transferidos a la biomasa o bien, expresa la fracción de energía del sustrato orgánico contenida en la biomasa y el tercero ( $\xi_p = z \gamma_p / \gamma_s$ ) representa a la fracción de electrones transferidos al producto o la energía contenida en el producto.

De un balance de N de la ecuación 5.3, se tiene que:

$$a = y_c * q + z * t \quad \text{Ec. 5.6}$$

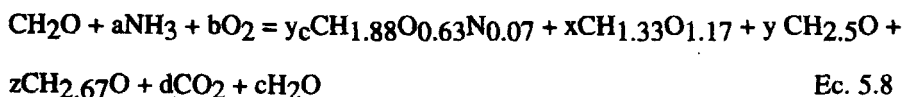
pero como el N no es consumido para la síntesis del producto, entonces  $t=0$  y 5.6 puede replantearse como:

$$a = \gamma_s * q * \eta / \gamma_b \quad \text{Ec. 5.7}$$

En este trabajo, los balances de materia y energía se aplicaron a las fermentaciones realizadas para verificar la consistencia entre los consumos de sustratos y la formación de productos, y para corroborar la confiabilidad de los rendimientos obtenidos.

En general, el contenido de nitrógeno en biomazas fúngicas se ubica entre 4 y 7% (Scragg, 1988). En el caso de la biomasa micelial de *Penicillium roquefortii*, Larroche y Gros (1992) analizaron su composición y establecieron la siguiente fórmula elemental:  $\text{CH}_{1.882}\text{O}_{0.603}\text{N}_{0.087}$ , lo cual significa que contiene el 4.9 % de N. Si se asume un 4% en la composición de N de la biomasa de *A. niger* (nivel mínimo) y se considera que la fracción de carbono en el biomasa es de 0.48, la cual es relativamente constante (Erickson y col, 1978), la fórmula elemental de *Aspergillus niger* en el medio de cultivo previamente diseñado (remitirse a 3.3.1) sería:  $\text{CH}_{1.88}\text{O}_{0.63}\text{N}_{0.07}$ .

En referencia al balance de materia y energía representado en la ecuación 5.3, las FES pueden representarse por el siguiente balance de materiales:



Donde:  $\text{CH}_2\text{O}$  es la glucosa,  $\text{CH}_{1.88}\text{O}_{0.63}\text{N}_{0.07}$  la biomasa,  $\text{CH}_{1.33}\text{O}_{1.17}$  el ácido cítrico,  $\text{CH}_2.5\text{O}$  el eritrol y  $\text{CH}_2.67\text{O}$  el glicerol.

Los coeficientes de cada componente de la ecuación 5.8 se encuentran en la Tabla 5.3, donde el consumo de oxígeno (b en la ecuación 5.4) se despejó y resolvió para cada

una de las fermentaciones, considerando los datos de la Tabla 5.1 (para los tiempos iniciales y finales de la fermentación). Se consideró que los componentes de la ecuación 5.8 contienen: 0.4 g de Carbono/g de glucosa, 0.48 gC/g de biomasa, 0.375 gC/g de cítrico, 0.39 gC/g de eritrol y 0.39 gC/g de glicerol; encontrando que  $b$  en F50 es muy pequeño (Tabla 5.3); en contraste con el consumido por el resto de las fermentaciones, el cual permaneció alto y con ligeras variaciones; es decir que en el caso de F50, casi la totalidad de electrones disponibles en el sustrato fueron transferidos a la biomasa, reflejándose en un alto  $\eta$  (Tabla 5.4); en tanto que, en las otras FES, los electrones transferidos a la biomasa ( $\eta$ ) disminuyeron al mismo tiempo que aumentaron los transferidos al producto, conforme la concentración de glucosa inicial aumentó. Cabe señalar, que los electrones transferidos al producto estuvieron contenidos principalmente en el ácido cítrico, los cuales representaron aproximadamente el 70% de los valores en  $\xi_p$  (Tabla 5.4).

Por otro lado, también se observa en la Tabla 5.3 que la concentración de ácido cítrico y eritrol se elevaron a medida que la glucosa aumentó, excepto para F200, en que el tiempo de fermentación fue tan largo que el eritrol fue empleado como sustrato. Mientras que el glicerol fue sintetizado a partir de F300.

La disminución de los  $\eta$  y el aumento de los  $\xi_p$ , también indicaron una desviación en el metabolismo, en donde la energía del sustrato orientada hacia la formación de biomasa disminuyó al aumentar la concentración inicial de glucosa; mientras que, la energía canalizada hacia la formación de producto aumentó.

En los balances de la Tabla 5.3, se observa que la composición de N asumida en la biomasa, coincidió con los moles de amoníaco alimentados en forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para cada una de las FES ( $a=q \cdot y_c$ ), lo que sugirió que el crecimiento estuvo limitado en N y que la concentración máxima de biomasa que se puede llegar a obtener es de 52.5 mg/gRS, que fue similar a la biomasa máxima cuantificada experimentalmente en las FES (Tabla 5.1), excepto para F400.

De la ecuación 5.7, puede estimarse  $\eta$  para cada una de las FES, obteniéndose valores idénticos a los reportados en la Tabla 5.4, los cuales fueron calculados para  $\eta = y_c \cdot \gamma_b / \gamma_s$ . Esta comparación entre ambas estimaciones de  $\eta$  confirmaron:

- i) La limitación por N en el medio de cultivo; ya que todo el N alimentado se incorporó en la biomasa.
- ii) Que no existieron productos (diferentes a la biomasa) que contuvieran N.

iii) Que los rendimientos experimentales ( $y_c$ ) encontrados por el análisis en la formación de biomasa con respecto a la glucosa consumida fueron confiables.

Tabla 5.3 Resultados de los balances de materiales en las fermentaciones de acuerdo a la ecuación 5.8.

Coefficiente	F50	F100	F200	F300	F400
a	0.06	0.03	0.015	0.013	0.011
b	0.01	0.48	0.61	0.56	0.51
c	0.21	0.58	0.68	0.6	0.54
d	0.05	0.49	0.57	0.53	0.46
$y_c$	0.88	0.46	0.22	0.18	0.15
x	0.04	0.03	0.21	0.2	0.27
y	0.03	0.02	-	0.07	0.09
z	-	-	-	0.02	0.03

Donde: a, b, c y d son los moles entre la cantidad de glucosa contenida en un átomo-gramo de Carbono (C) de  $\text{NH}_3$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CO}_2$ , respectivamente.  $y_c$ , x, y, z son los rendimientos de carbono: en la biomasa (g de C de la biomasa/g de C de la glucosa), en el ácido cítrico, en el eritrol y en el glicerol.

Tabla 5.4 Distribución de la energía del sustrato.

	F50	F100	F200	F300	F400
$4b/\gamma_s$	0.01	0.48	0.61	0.56	0.51
$\eta$	0.92	0.48	0.23	0.19	0.16
$\xi_p$	0.07	0.04	0.16	0.25	0.33

Donde:  $4b/\gamma_s$  es la fracción de electrones disponibles en el sustrato transferidos al oxígeno,  $\eta$  es la fracción de electrones contenidos en la biomasa ( $\eta = y_c \gamma_b / \gamma_s$ ) y  $\xi_p$  es la fracción de electrones transferidos al producto que corresponde a la suma de las fracciones de los electrones contenidos en el ácido cítrico, eritrol y glicerol.

Nota: las discusiones concernientes al eritrol y al glicerol serán tratadas en siguiente capítulo.

Además, en la Tabla 5.3 se destaca la alta producción de  $\text{CO}_2$  y agua en las FES. La humedad fue medida en el transcurso de las fermentaciones y se muestra en la Figura 5.10, donde puede apreciarse un incremento progresivo. Los valores experimentales de humedad al final de la fermentación fueron similares a los calculados en la Tabla 5.3.

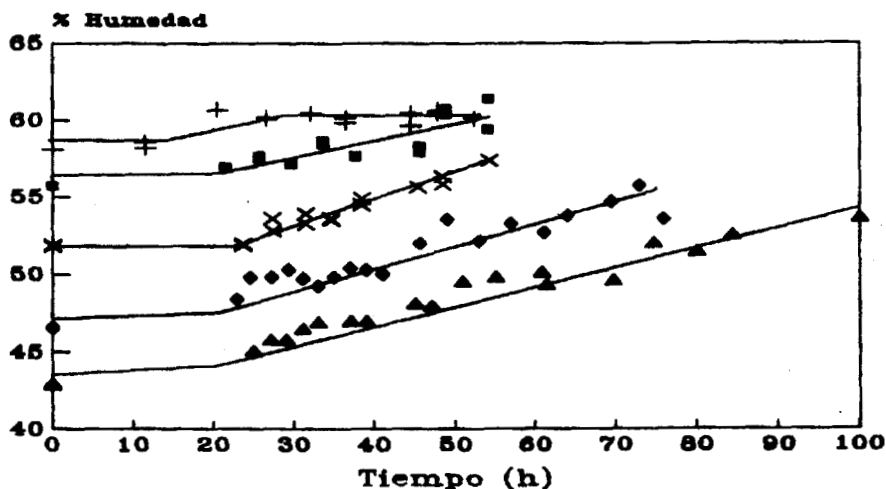


Fig. 5.10. Humedad (%) en el curso de las fermentaciones. (+) F50, (■) F100, (X) F200, (◆) F300, (▲) F400

### 5.3 CONCLUSIONES

Las fases de adaptación en *A. niger* no fueron afectadas al aumentar la concentración de glucosa en las fermentaciones.

Las velocidades específicas de crecimiento fueron afectadas ligeramente al aumentar la concentración inicial de glucosa, disminuyendo de  $0.35$  a  $0.2 \text{ h}^{-1}$  con el aumento de  $50$  a  $400 \text{ g/l}$  de glucosa. Los parámetros de esta baja inhibición por sustrato fueron:  $K_i$  de  $259 \text{ g de glucosa/l}$  y una  $\mu_{\max}$  de  $0.4 \text{ h}^{-1}$ .

En la fermentación a  $300 \text{ g de glucosa/l}$  (a la  $A_w$  de  $0.95$ ) se obtuvo un máximo en esporulación de  $1.4 \cdot 10^9$  esporas/gRS, que podría relacionarse con la elevada producción de ácido cítrico. La producción de ácido cítrico máxima en F300 fue de  $85 \text{ g/l}$ , el rendimiento de  $0.385 \text{ (g/g)}$  y la productividad de  $1.21 \text{ g/(g·h)}$ ; de las cuales, la producción y la productividad fueron superiores a los reportadas en cultivo líquido.

Conforme la concentración de glucosa aumentó (de  $50$  a  $400 \text{ g/l}$ ), el rendimiento en la formación de biomasa por glucosa consumida ( $Y_{x/s}$ ) disminuyó progresivamente (desde  $0.73$  a  $0.13$ ). Este comportamiento del  $Y_{x/s}$  sugirió una desviación en el metabolismo.

Con balances de materia y energía se verificó la consistencia entre los consumos y los productos, se evidenció una limitación por nitrógeno en las fermentaciones y se probó la confiabilidad de los rendimientos cuantificados experimentalmente.

Los balances de materia y energía indicaron una desviación en el metabolismo, al comparar la distribución de los electrones disponibles de la glucosa en la biomasa y productos; observando que, cuando la concentración inicial de glucosa se incrementó, los electrones transferidos a la biomasa disminuyeron, mientras que los transferidos al producto aumentaron.

Se propone este sistema de FES para la producción de ácido cítrico, realizando algunas modificaciones en el medio de cultivo.

#### 5.4 Perspectivas de aplicación

La alta producción y productividad de ácido cítrico en el presente trabajo (superiores a las reportadas en fermentación sumergida (FSm)) podrían ser influenciadas por la resina empleada como soporte, la cual manifiesta una gran afinidad por los iones citrato (ver Anexo A), pudiendo incorporarlos en su matriz y minimizar de esta manera el efecto inhibitorio que pudiera tener sobre su propia síntesis. Por consecuencia, este sistema de FES puede usarse para la producción y separación de ácido cítrico.

Una idea similar a esta propuesta, es la fermentación extractiva de ácido láctico (Srivastava y col. 1992), que consiste en hacer pasar por una columna empacada con una resina de intercambio iónico, un caldo de cultivo proveniente de una fermentación láctica (en FSm), la resina adsorbe el lactato y el caldo vuelve a incorporarse al fermentador. Los rendimientos y las productividades fueron aumentados con la adopción de esta técnica.

Los elementos traza tienen un efecto negativo en la producción de ácido cítrico (Marison, 1988b), su rendimiento, producción y productividad podrían ser mejorados con el rediseño del medio de cultivo. Las modificaciones del medio se sugieren por la comparación entre las concentraciones de los elementos traza manejadas en este trabajo y los reportados en FSm por Roukas y Kotzekidou (1987) (Tabla 5.2).

En este contexto, Jernejc y col. (1989) investigaron la función del manganeso en la producción de ácido cítrico, encontrando una inhibición del 80% en una fermentación con 1.1 mg/l de  $Mn^{2+}$  con respecto a otra con 10.2 mg/l de  $Cu^{2+}$  y sin  $Mn^{2+}$ .

Las concentraciones de  $Mn^{2+}$ , empleadas en este trabajo fueron superiores a las manejadas por Jernejc y col. (1989); sin embargo, eso no significa que al eliminar el  $Mn^{2+}$  en la FES se obtendrán producciones que se elevarán en aproximadamente el 100%. Probablemente los fenómenos inhibitorios en FSm sean diferentes a los presentes en FES, pero constituye una información que merece considerarse.

**Tabla 5.5 Comparación del efecto de los elementos traza en la producción de ácido cítrico por FES y FSm.**

Catión	Concentración óptima (mg/l)*	Concentración inhibitoria (mg/l)*	% inhibición*	MC (mg/l)
$Mn^{2+}$	0.056	0.146	21	1.57
$Zn^{2+}$	0.075	0.17	42	5
$Co^{2+}$	0	0.5	51.5	0.43
$Cu^{2+}$	0	0.5	10	0.41
$Ca^{2+}$	2	100	53	175

Los datos (\*) fueron tomados del artículo (en FSm) de Roukas y Kotzekidou (1987). MC es el medio de cultivo empleado en este trabajo.

**EFFECTO DE LA CONCENTRACION  
DE GLUCOSA EN LA PRODUCCION  
DE ACIDO CITRICO EN *A. niger***

## **6 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA EN LA PRODUCCION DE ACIDO CITRICO EN *A. niger***

En este trabajo, la principal variable de las fermentaciones fue la fuente de carbono y energía. Por consecuencia, a medida que se aumentó la concentración de glucosa en el medio, el potencial osmótico disminuyó. El mecanismo que los hongos poseen para hacer frente al estrés osmótico es esencialmente la osmorregulación, que involucra la síntesis de polioles (ver sección 2.5.1). Sin embargo, a pesar que estos solutos compatibles se distinguen por proteger algunas actividades enzimáticas (Brown, 1978) y causar los mínimos efectos inhibitorios a nivel del crecimiento microbiano; se ha encontrado que el glicerol inhibe la actividad de la isocitrato-deshidrogenasa (ICDH), a la cual se responsabiliza de la acumulación de ácido cítrico (Legiša y Matthey, 1986a y b, 1988; Legiša y Kidric, 1989).

El propósito de este análisis fue contribuir al establecimiento de los mecanismos de osmorregulación en *A. niger* en FES, como consecuencia del incremento en la concentración de glucosa en FES. Además, se investigó quien es el principal soluto que intervino en la osmorregulación y la función que desempeñó el glicerol en la acumulación de ácido cítrico.

### **6.1 OSMORREGULACION**

Los únicos polioles que se biosintetizaron en las fermentaciones de esta investigación fueron el eritrol y el glicerol, los cuales tienen la característica de ser de cadena corta, lo que implica la mínima inhibición de enzimas (Brown, 1978).

#### **6.1.1 Eritrol**

En la Figura 6.1 se presenta la producción de eritrol en función del tiempo de fermentación. La biosíntesis del eritrol se inició a partir de las 30 h de fermentación y su producción se prolongó dependiendo de la concentración inicial de glucosa. La velocidad en la producción del eritrol aumentó al incrementar la concentración de glucosa, con excepción de F400 que disminuye (Fig. 5.5). Sin embargo, las cinéticas de producción de eritrol en F300 y F400 fueron parecidas, sugiriendo que el eritrol osmorreguló cuando las condiciones osmóticas del entorno no fueron severas (F50, F100 y F200). Cabe mencionar, que la síntesis de eritrol aumentó con el tiempo y

continuó su ascenso aún después que el crecimiento cesó, lo que sugirió que parte del eritrol es excretado; además las concentraciones que alcanzó fueron superiores a las reportadas por Adler y col. (1982) como concentración intracelular para *Aspergillus niger* (hasta 0.6  $\mu\text{moles/mg}$  de biomasa en un medio con 12% de NaCl). En F100 y F200, se observó un consumo de eritrol en las etapas finales de la fermentación, con lo que se mostró que adicionalmente de su papel como osmorregulador, también puede funcionar como carbohidrato de reserva. Esto ocurrió cuando la glucosa se agotó y la influencia del reducido potencial osmótico desapareció (Blomberg y Adler, 1992).

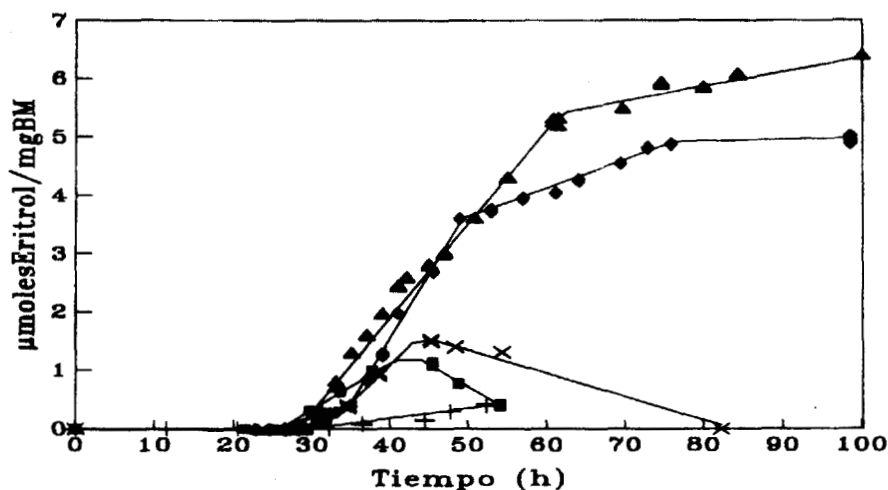


Fig. 6.1 Cinética de producción específica de eritrol. BM es la biomasa. (+) F50, (■) F100, (X) F200, (●) F300, (▲) F400.

### 6.1.2 Glicerol

El glicerol sólo se biosintetizó a partir de F300, lo que indicó que su papel como osmorregulador fue requerido por *A. niger* a actividades de agua menores a 0.92, cuando se utiliza a la glucosa como depresor de la  $A_w$  (Fig. 6.2).

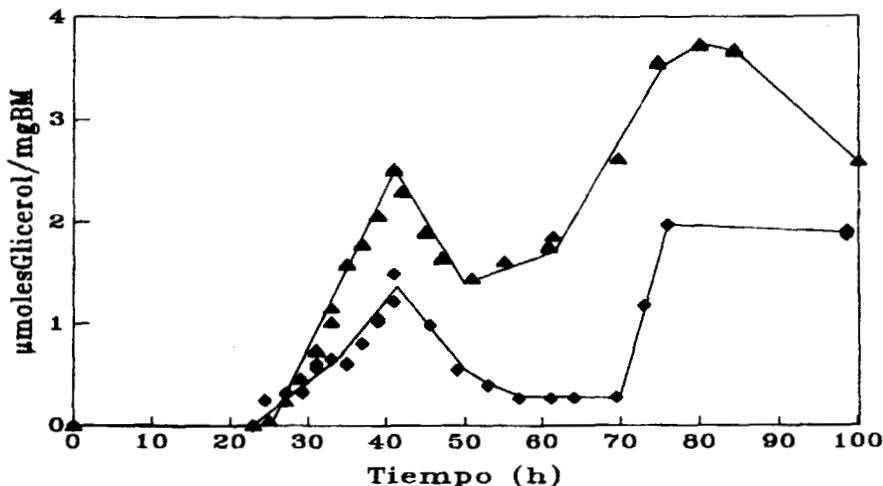


Fig. 6.2 Cinética de producción específica de glicerol para F300 (◆) y F400 (▲)

En la Figura 6.3 se presenta la concentración de polioles ( $\mu\text{moles/mg}$  de biomasa) a las 40h de cultivo, es decir cuando cesó del crecimiento, donde puede observarse que al incrementar la concentración de glucosa inicial, la biosíntesis de polioles aumentó, y que el principal osmorregulador en estas fermentaciones fue el eritrol. Este resultado no concuerda con lo reportado por Adler y col. (1982), quienes encontraron al glicerol como el principal osmorregulador en *A. niger*, empleando NaCl como depresor de la  $A_w$ . Esto parecería indicar que el soluto externo influencia al tipo de soluto acumulado intracelularmente, pero no en la relación sugerida por Adler y col. (1982), quienes comentaron que el glicerol es el soluto que preferentemente emplea *A. niger* bajo un estrés salino y que los medios con una concentración elevada de azúcar promueven la acumulación de polioles de cadena larga (por ejemplo manitol y arabinitol).

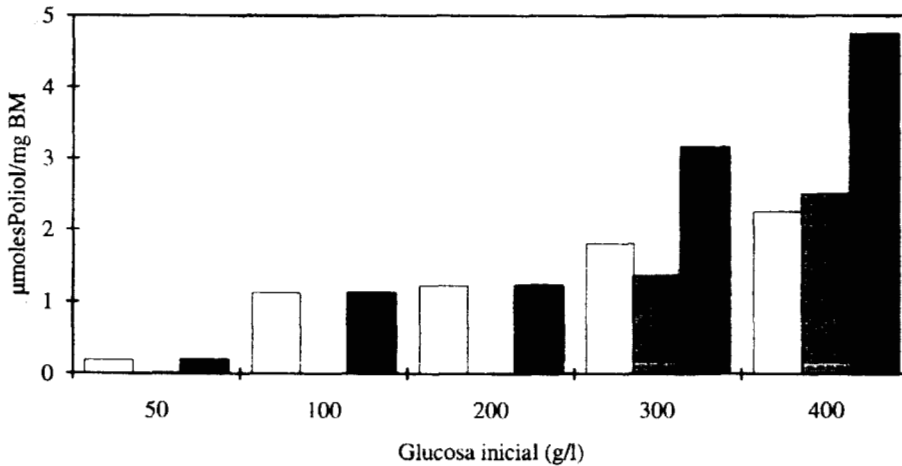


Fig. 6.3. Producción de poliols a las 40 h de fermentación.

□ µmoles Eritrol/gRS   ■ µmoles Glicerol/gRS   ■ µmoles Polioli/gRS

## 6.2 PAPEL DEL GLICEROL EN LA ACUMULACION DE ACIDO CITRICO

Legiša y Matthey (1986a y b) fueron los primeros en proponer al glicerol como iniciador de la acumulación de ácido cítrico en cultivo líquido con *A. niger*. Su propuesta se fundamenta en estudios enzimáticos en los que detectan la actividad de enzimas que regulan la ruta pentosafofosfato (HMP) (glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconatodeshidrogenasa (6PGDH)) y la glucólisis (EMP) (6-fosfofructocinasa (6PFK)) (Legiša y Matthey, 1988). Se encontró que en el inicio del cultivo (después de la germinación de esporas), el metabolismo del hongo procede por la ruta HMP y la síntesis de glicerol funciona para reoxidar el excedente de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  generado por su funcionamiento. La concentración intracelular de glicerol que se alcanza es capaz de inhibir a la isocitrato-deshidrogenasa (ICDH) y el citrato empieza a acumularse dentro de la célula (Legiša y Kidric, 1989). A su vez el citrato acumulado inhibe a la 6GDH, con lo que se detiene el metabolismo vía HMP y se activa el funcionamiento de la glucólisis, suspendiendo la biosíntesis del glicerol. La acumulación de ácido cítrico inicia lentamente, pero se incrementa a medida que el glicerol se consume.

En relación a esos antecedentes, en este trabajo se intentó relacionar la acumulación de ácido cítrico con la biosíntesis de glicerol. Las Figuras 6.4b y 6.5

representan la biosíntesis de glicerol, ácido cítrico y biomasa en función del tiempo de fermentación para F300 y F400. La biosíntesis de glicerol se inició al mismo tiempo que el arranque del crecimiento y alcanzó su valor máximo justo cuando el crecimiento se detuvo, siendo en ese momento cuando comenzó la síntesis de citrato.

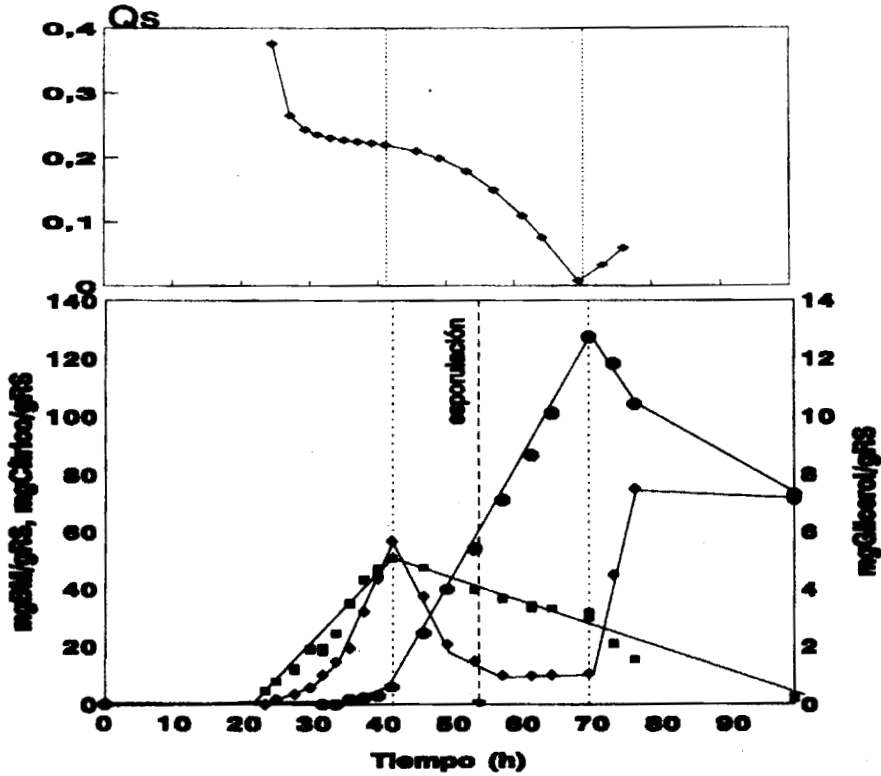


Fig.6.4a Cambios en las velocidades específicas de consumo de glucosa ( $Q_s$ ) en F300.

Nota: En este análisis, se ajustó al consumo de glucosa un polinomio de grado 5, se derivó y se dividió a cada tiempo entre la biomasa, considerando que la biomasa se mantiene constante cuando llega a su máximo valor.

Fig. 6.4b. Cinética de producción de glicerol y ácido cítrico durante el crecimiento en F300. (■) biomasa (mg/gRS), (●) ácido cítrico (mg/gRS) y (◆) glicerol (mg/gRS).

Además de lo encontrado en los trabajos de Legiša y Matthey, en la Figura 6.4b se muestra que cuando la concentración de glicerol llegó a su nivel más bajo (55 h), se inició el cambio de morfología del hongo de hifa a espora, manteniendo la misma velocidad de síntesis de ácido cítrico. Una vez que el ácido cítrico alcanzó la máxima

concentración, se reinició la síntesis de glicerol y el ácido cítrico comenzó a ser consumido. Al parecer, el ácido cítrico alcanzó una concentración tal que inhibió a la enzima clave del funcionamiento de la glucólisis, la fosfofructocinasa (Voet y Voet, 1990a). Dicha ruta es la que sustenta la actividad metabólica durante la producción de ácido cítrico (Legiša y Matthey, 1988) y puede ser que se haya reactivado la 6PGDH, permitiendo la continuidad del metabolismo vía HMP.

En la Figura 6.5, la concentración de biomasa y de glicerol máximos no se ubicaron en el mismo tiempo de fermentación en F400. Sin embargo, el primer pico de glicerol coincidió con el inicio de la biosíntesis de cítrico y el nivel mínimo en glicerol coincidió con el inicio de la esporulación. Se observa que la velocidad de producción de cítrico no fue tan alta como en F300 (Fig.6.4b), probablemente porque las concentraciones de glicerol no disminuyeron tanto como en F300, ya que también desempeñó un papel como osmorregulador, debido a que los potenciales osmóticos en el medio de F400 son más reducidos que en F300. En F400 pueden apreciarse más etapas de regulación que en F300, pero se encuentran sincronizadas, en el momento en que el glicerol se mantuvo en su nivel mínimo, el ácido se produjo a una velocidad constante, y al mismo tiempo que la síntesis de glicerol reinició, la formación de cítrico se detuvo.

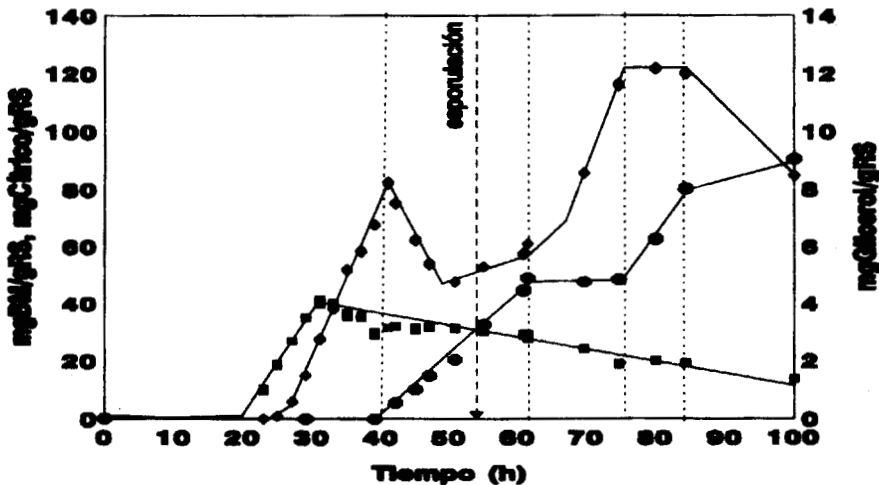


Fig. 6.5. Cinética de producción de glicerol y ácido cítrico durante el crecimiento en F400.(■) biomasa (mg/gRS), (●) ácido cítrico (mg/gRS) y (◆) glicerol (mg/gRS).

Otra manera de evidenciar el funcionamiento alternado de las rutas metabólicas fue con la variación del coeficiente metabólico ( $Q_s$ ) como se muestra en la Figura 6.4a, donde se presenta la trayectoria de  $Q_s$  en función del tiempo para F300. Los tiempos en que ocurrieron las inflexiones de las curvas correspondieron a los cambios de rutas metabólicas pronosticadas con los niveles en las concentraciones de glicerol y ácido cítrico.

Finalmente, cabe señalar que la producción de ácido cítrico en F200 fue elevada aunque no se haya detectado la presencia de glicerol. Evidentemente, el glicerol en esta fermentación no actuó como iniciador de la síntesis del ácido y llama la atención que nuevamente, la acumulación de ácido cítrico se inició justo cuando la biomasa alcanzó su nivel máximo y el pH su nivel mínimo. Legiša y Matthey (1989) encontraron una disminución en el pH intracelular (de 7.1 a 6.5) relacionada con la caída del pH extracelular en *A. niger* y como bien se sabe, la actividad de las enzimas dependen del pH, por lo que el pH influncia las velocidades metabólicas. Meixner-Monori y col. (1986) investigaron la extrema sensibilidad de la ICDH ante las condiciones ligeramente ácidas, pudiendo ser ésta una razón por la que se acumula el ácido cítrico en las fermentaciones, pero la inhibición de la ICDH pudiera ser potencializada por la intervención del glicerol.

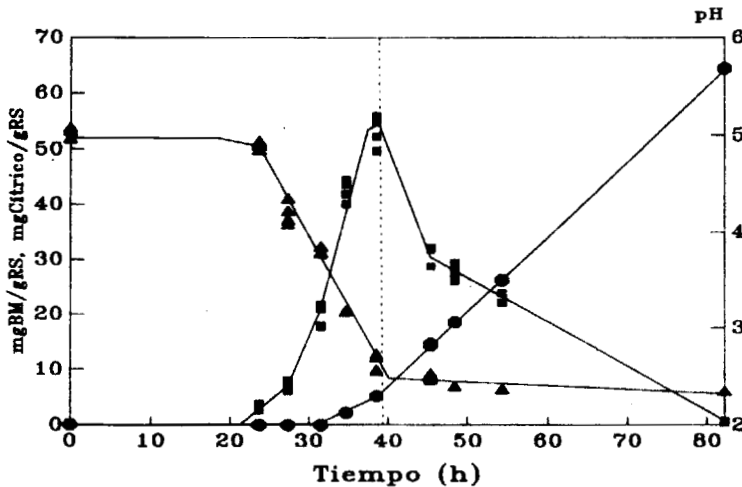


Fig. 6.6. Influencia del pH en la acumulación de ácido cítrico en F200.(■) biomasa (mg/gRS), (●) ácido cítrico (mg/gRS) y (▲) pH.

### 6.3 CONCLUSIONES

Los polioles responsables de la osmorregulación de *A. niger* en FES (con glucosa como soluto depresor de la  $A_w$ ) fueron el eritrol y el glicerol; de los cuales, el eritrol fue el que actuó como principal osmorregulador. Por su parte, el glicerol sólo se produjo a las concentraciones iniciales de glucosa de 300 y 400 g/l, lo que sugirió que fue el osmorregulador empleado en condiciones osmóticas extremas.

El glicerol se biosintetizó al inicio del crecimiento y se mostró que al igual que en cultivo líquido fue el iniciador de la acumulación de ácido cítrico. Posteriormente, cuando la biosíntesis de glicerol volvió a ocurrir, la producción de ácido cítrico se detuvo y viceversa, resultando evidente la influencia que uno ejerce sobre la síntesis del otro.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

## 7 CONCLUSIONES GENERALES

El tratamiento propuesto para minimizar la capacidad de intercambio iónico de la resina consistió en mantenerla con una solución de  $\text{SO}_4^{=}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Este tratamiento se justificó al comparar el comportamiento que *A. niger* mostró en las FES empleando como soporte a una resina no tratada y a una tratada.

En FES, las fases de adaptación de *A. niger* no fueron afectadas al aumentar la concentración inicial de glucosa de 50 a 400 g/l.

Las velocidades específicas de crecimiento disminuyeron de 0.35 a 0.2  $\text{h}^{-1}$  al aumentar la concentración inicial de glucosa de 50 a 400 g/l. Los parámetros de esta inhibición por sustrato fueron:  $K_i$  de 259 g de glucosa/l y  $\mu_{\text{max}}$  de 0.4  $\text{h}^{-1}$ .

Conforme la concentración de glucosa se incrementó, el rendimiento en la formación de biomasa por glucosa consumida ( $Y_{x/s}$ ) disminuyó progresivamente desde 0.73 a 0.13. Este comportamiento del  $Y_{x/s}$  sugirió una desviación en el metabolismo.

En la fermentación con 300 g/l de glucosa se obtuvo un máximo en esporulación de  $1.4 \cdot 10^9$  esporas/gRS y se alcanzó una producción máxima de 85 g/l de ácido cítrico, un rendimiento de 85 (g/l) y una productividad de 1.21 (g/(l·h)) que fueron superiores a los reportadas en cultivo líquido.

Los polioles detectados responsables de la osmorregulación de *A. niger* en FES (con glucosa como soluto depresor de la  $A_w$ ) fueron el eritrol y el glicerol; de los cuales, el principal osmorregulador fue el eritrol. Por su parte, el glicerol sólo se produjo a las concentraciones iniciales de glucosa de 300 y 400 g/l, lo que sugirió que fue el osmorregulador empleado en condiciones osmóticas extremas.

Al igual que en cultivo líquido, el glicerol mostró que es el iniciador de la acumulación de ácido cítrico. Posteriormente, cuando la biosíntesis de glicerol volvió a ocurrir, la producción de ácido cítrico se detuvo y viceversa; resultando evidente la influencia que ejerce el uno sobre la síntesis del otro.

## 10 BIBLIOGRAFIA

Adler, L., Pederson, A. and Tunblad-Johansson, I., 1982. Polioliol accumulation by two filamentous fungi grown at different concentration of NaCl. **Physiol. Plant.** 56 : 139-142.

Aiba, S., Humphrey, A.E. & Mills N.F., 1973. **Biochemical Engineering.** Academic Press Inc.

Aido, K. E., Hendry, R. & Wood, J.B., 1982. Solid state fermentation. **Adv. Microbiol.** 28: 201-237.

Auria, R., Hernandez, S., Raimbault, M. and Revah, S., 1990. Ion exchange resin: a model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. **Biotechn, Techn.** 4(6) : 391-396.

Auria, R., Morales, M., Villegas, E. & Revah, S., 1993. Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentation of *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Bioeng.** 41: 1007-1013.

Beever, R.E. & Laracy, E.P., 1986. Osmotic adjustment in filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **J. Bacteriol.** 168 (3): 1358-1365.

Benezra, L., 1967. Ion-exchange polymers. En: **Encyclopedia of Polymer Science and Technology.** Ed. H.F. Mark, N.G. Gaylord & N.M. Bikales. J. Wiley & Sons, Inc. New York: 7: 693-740.

Bloomberg, A. & Adler, L., 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances microbial physiology.** 33: 145-212.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72 : 248-254.

Brandao, R.L. & Loureiro- Dias, M.C., 1990. Regulation of sugar transport systems in *Fusarium oxysporum* var. lini. **Appl. Environ. Microbiol.** 56(8): 2417-2420.

- Bricio O., Coca, J. & Sastre H., 1992. A comparative study of kinetic models for ion-exchange using macroporous resins and concentrated solutions. **Solvent Extraction and Ion Exchange**. 10 (2): 381-401.
- Broderick & Greenshields, 1982. Semi-continuous and continuous production of *Aspergillus niger* spores in submerged liquid culture. **J. Gen. Microbiol.** 128: 2639-2645.
- Brown, A.D., 1978. Compatible solutes and extreme water stress. En: **Advances in Microbial Physiology**. Ed. A.H. Rose & J.G. Morris. Academic Press, London-New York. 17: 181-242.
- Bull, A.T. & Bushell, M.E., 1976. Environmental control of fungal growth. En: **Biosynthesis and Metabolism**. Edward Arnold Ltd.
- Cassidy, R.M. & Elchuk, S., 1983. Dynamically coated columns and conductivity detection for trace determination of organic anions by ion chromatography. **J. Chromatography**. 262: 311.
- Clutterbuck, A.J., 1974. *Aspergillus nidulans*. En: **Handbook of Genetics**. Ed. Plenum Pub., New York, USA.
- Csonka, L.N., 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stresses. **Microbiol. Reviews**. 53 (1): 121-147.
- Chang L.T. and Elander R.P., 1986. Long-term preservation of industrially important microorganisms. En: **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Ed. A.L. Demain and N.A. Solomon. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Donèche, B., 1989. Carbohydrate metabolism and gluconic acid synthesis by *Botrytis cinerea*. **Can. J. Bot.** 67: 2888-2893.
- Erickson, L.E., Minkevich, I.G. & Eroshin, V.K., 1978. Application of mass and energy balance regularities in fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 20:1595-1621.
- Grajek, W. & Gervais, P., 1987. Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid state fermentation. **Enzyme Microb. Technol.** 9: 658-662.

Gervais, P., Molin, P. & Bensoussan, M., 1988. Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. **Biotechnol. Bioeng.** 31:457-463.

Hesseltine, C.W., 1972. Solid state fermentations. **Biotechnol. Bioeng.** 14: 517-532.

Hondmann, D.H.A., Busink, R., Witteveen, C.F.B. and Visser, J., 1991. Glycerol catabolism in *Aspergillus nidulans*. **J. Gen. Microbiol.** 137: 629-636.

Hosono, K., 1992. Effect of salt stress on lipid composition and membrane fluidity of the salt tolerant yeast *Zigosaccharomyces rouxii*. **J. Gen. Microbiol.** 138: 91-96.

Jernejc, K., Vendramin, M. and Cimerman A., 1989. Lipid composition of *Aspergillus niger* in acid citric accumulating and nonaccumulating conditions. **Enzyme Microb. Technol.** 11: 452-456.

Kirimura, K., Sarangbin, S., Rugsaseel, S. & Usami, S., 1992. Citric acid production by 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of *Aspergillus niger*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36: 573-577.

Knapp, J.S. & Howell, J.A., 1980. Solid state fermentation. En: **Topics Enzyme Ferment. Biotechnol.** Ed. A. Wiseman. Vol. 4, John Wiley.

Kubicek, C.P. & Röhr, M., 1985. Aconitase and citric fermentation by *Aspergillus niger*. **Appl. Envir. Microbiol.** 50(5): 1336-1338.

Larroche, C. & Gros, J.B., 1992. Characterization of the growth and sporulation behavior of *Penicillium Roquefortii* in solid state fermentation by material and bioenergetic balances. **Biotechn. Bioeng.** 39 : 815-827.

Laukevics, J.J., Apsite, A.F., Viesturs, U.S. & Tengerdy, R.P., 1985. Steric Hindrance of growth of filamentous fungi in solid substrate fermentation of wheat straw. **Biotechnol. Bioeng.** 27 : 1687-1691.

Lee, Y.H., Lee, C.W. & Chang, N.H., 1989. Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on polyurethane foam. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 30: 141-143.

Legiša, M. and Matthey, M., 1986a. Glycerol as an initiator of citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. **Enzyme Microb. Technol.** 8 : 258-259.

Legiša, M. and Matthey, M., 1986b. Glycerol synthesis by *Aspergillus niger* under citric acid accumulating conditions. **Enzyme Microb. Technol.** 8: 607-609.

Legiša, M. and Matthey, M., 1988. Citrate regulation of the change in carbohydrate degradation during the initial phase of the citric acid production by *Aspergillus niger*. **Enzyme Microb. Technol.** 10: 33-36.

Legiša, M. and Kidric, J., 1989. Initiation of citric acid accumulation in the early stages of *Aspergillus niger*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** :453-457.

Laukevics, J.J., Apsite, A.F., Viesturs, U.S. & Tengerdy, R.P., 1985. Steric hindrance of growth of filamentous fungi in solid substrate fermentation of wheat straw. **Biotechnol. Bioeng.** 27: 1687-1691.

Lockwood, L.B., 1973. Organic acid production. En: **The Filamentous Fungi**. Ed. J.E. Smith & D.R. Berry & B. Kritiansen. Edward Arnold Publisher, London. 3:

Luard, E.J., 1982a. Accumulation of intracellular solutes by two filamentous fungi in response to growth at low steady state osmotic potential. **J.Gen. Microbiol.** 128: 2563-2574.

Luard, E.J., 1982b. Effect of osmotic shock in some intracellular solutes in two filamentous fungi. **J.Gen. Microbiol.** 128: 2575-2581.

Luard, E.J., 1982c. Growth and accumulation of solutes by *Phytophthora cinnamomi* and other lower fungi in response to changes in external osmotic potential. **J.Gen. Microb.** 128: 2583-2590.

Marier, J.R. & Boulet, M., 1958. Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method. **J. Dairy Sci.** 41: 1683.

Marison, I.W., 1988a. Growth kinetics. En: **Biotechnology for Engineers**. Ed. A. Scragg. Ellis Horwood Limited. Chichester.

Marison, I.W., 1988b. Citric acid production. En: **Biotechnology for engineers**. Ed. A. Scragg. Ellis Horwood Limited. Chichester.

Meixner, O., Mischak, H., Kubicek, C.P. & Röhr, M., 1985. Effect of manganese deficiency on plasma membrane lipid composition and glucose uptake in *Aspergillus niger*. **FEMS Microbiol. Lett.** 26: 271-274.

Meixner-Monory, B., Kubicek, C.P., Harrer W., Schrefell, G. & Röhr, M., 1986. NADH<sup>+</sup>-specific isocitrate dehydrogase from the citric acid accumulating fungus *Aspergillus niger*. **Biochem. J.** 236: 549-555.

Moo-Young, M., Moreira, A.R. & Tengerdy R.P., 1983. Principles of solid substrate fermentation. En: **The Filamentous Fungi**. Ed. J.E. Smith, D.R. Berry & B. Kritiansen. Edward Arnold Publisher, London. 4: 171-188.

Moo-Young, M., Chisti, Y. & Vlach, D., 1992. Fermentative conversion of cellulosic substrates to microbial protein by *Neurospora sitophila*. **Biotechnol. Lett.** 14 (9): 863-868.

Mudgett, E.R., 1986. Solid state fermentations. En: **Manual of Industrial Microbiology & Biotechnology**. Ed. A.L. Demain and N.A. Solomon. American Society for microbiology. Washington, D.C: 66-83.

Oriol, E., Schettino, B., Viniegra, G. and Raimbault, M., 1988. Solid state culture of *Aspergillus* on support. **J. Ferment. Technol.** 66(1) : 000-000.

Pandey A., 1992. Recent process developments in solid State Fermentation. **Process Biochemistry.** 27:109-117.

Pirt, S.J., 1975a. Parameters of growth and analysis of growth data. En: **Principles of Microbe and Cell Cultivation**. Blackwell Sci. Pub., London.

Pirt, S.J., 1975b. Effects of water activity and medium tonicity. En: **Principles of Microbe and Cell Cultivation**. Blackwell Sci. Pub., London.

Pirt, S.J., 1975c. Effects of chemical inhibition and activation of growth. En: **Principles of Microbe and Cell Cultivation**. Blackwell Sci. Pub., London.

Raimbault, M. and Alazard, D., 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European J. Appl. Microbiol.** 9 : 199-209.

Ralph, B.J., 1976. Solid substrate fermentations. **Food Technol. Aust.** 28: 247-251.

Roels J.A., 1980. Application of macroscopic principles to microbial metabolism. **Biotechnol. Bioeng.** 22: 2457-2514.

- Robson, G.D., Wiebe, M.G. & Trinci, A.P.J., 1991. Exogenous cAMP and cGMP modulate branching in *Fusarium graminearum*. **J. Gen. Microbiol.** 137: 963-969.
- Rohm & Haas company, 1984. Technical bulletin: **Fluid Process Chemicals**.
- Ruokas, T. & Kotzekidou, P., 1987. Influence of some trace metals and stimulants on citric acid production from brewery by *Aspergillus niger*. **Enzyme Microb. Technol.** 9: 291-294.
- Schuurink, R., Busink, R., Hondmann, D.H.A., Witteveen, C.F.B. & Visser, J., 1990. Purification and properties of NADP-dependent glycerol dehydrogenases from *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*. **J. Gen. Microbiol.** 136: 1043-1050.
- Scragg, A.H., 1988. Media preparation and sterilization. En: **Biotechnology for Engineers**. Ed. A. Scragg. Ellis Horwood Limited. Chichester.
- Shankaranand, V.S., Ramesh, M.V. and Lonsane B.K., 1992. Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. **Process Biochem.** 27 : 33-36.
- Sherma, J., 1972. Liquid column Chromatography. En: **Handbook of chromatography**. Ed. G. Zweig & J. Sherma. Ohio: CRC Press. 2: 54-60.
- Solis, S., Favela, E., Viniegra, G. and Gutierrez, M., 1993. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 9 : 199-209.
- Soccol, C.R., 1992. Physiologie et métabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée en relation avec la dégradation d' amidon cru et la production d' acide L(+) lactique. **Tesis de doctorado**, Université de Technologie de Compiègne.
- Srivastava, A., Roychoudhury, P.K. & Sahai V., 1992. Extractive lactic acid fermentation using ion-exchange resin. **Biotechnol. Bioeng.** 39: 607-613.
- Tengerdy, R.P., 1985. Solid substrate fermentation. **Trends in Biotechnol.** 3: 96-99.
- Trinci, A.P.J., 1971. Influence of the width of the peripheral growth rate of fungal colonies on solid media. **J. Gen. Microbiol.** 67: 325-344.

Vaamonde G., Chirife, J. & Scorza, O.C., 1982. An examination of the minimal water activity for *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P growth in laboratory media adjusted with less conventional solutes. **J. Food Sci.** 47:1259-1262.

Vaamonde G., Chirife, J. & Scarmato, G., 1984. Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth in laboratory media of water activity adjusted with polyethylene glycols. **J. Food Sci.** 49:296-297.

Vermeulen, T., Klein, G. & Hiester, N.K., 1986. Sorción y materiales sorbentes. En: **Perry, biblioteca del Ingeniero Químico**. Ed. R.H. Perry & C.H. Chilton. 4: 16.2-16.13.

Visser, J., 1991. Biochemical & molecular approaches in understanding carbohydrate metabolism in *Aspergillus niger*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 50: 111-113.

Voet D. & Voet J.G., 1990a. Glycolysis. En: **Biochemistry**. Ed. J, Stiefel. J. Wiley & Sons Inc. New york: 425-460

Voet D. & Voet J.G., 1990b. Citric acid. En: **Biochemistry**. Ed. J, Stiefel. J. Wiley & Sons Inc. New york: 507-527

Voet D. & Voet J.G., 1990c. Transport through membranes. En: **Biochemistry**. Ed. J, Stiefel. J. Wiley & Sons Inc. New york: 484-505

Wösten, H.A.B., Moukha, S.M., Sietsma, J.H. & Wessels, J.G.H., 1991. Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. **J. Gen. Microbiol:** 137: 2017-2023.

# **ANEXOS**

## ANEXO A

## Tratamiento de la resina

**A.1 Influencia sobre la retención de proteína del tiempo de exposición y de la concentración de fosfatos en el tratamiento de la resina.**

**Tabla A.1 Efecto del tiempo de exposición y de la concentración de fosfatos en el tratamiento de la resina, teniendo como variable de respuesta a la retención de seroalbúmina.**

Fosfatos (M)	Tiempo (min)		
	30 %*	60 %*	180 %*
0.25	45.2	47.5	33.8
0.50	11.6	00.0	00.0
0.75	11.1	00.0	00.0
1.00	14.1	00.0	00.0

\*porcentaje de proteína retenida ( promedio de dos valores).

Tratamiento: 1gRS+4ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (24 °C). Se lavó, se secó, se le añadió 4 ml de seroalbúmina bovina (1g/l) (exposición de 4h) y se analizó la proteína en el sobrenadante (Bradford, 1976).

Los datos de la Tabla A.1 se analizaron con el paquete estadístico SAS, mediante un ANOVA y una prueba de medias de Duncan.

ANOVA  $\alpha = 0.0001$  (modelo estadístico: la retención de proteína depende de la concentración de fosfatos en el tratamiento de la resina) (los niveles de tiempo estudiados no fueron significativos; por lo tanto, no se incluyeron en el modelo estadístico).

**Prueba de Duncan:**

A	0.25 M
B	0.50 M
B	0.75 M
B	1.00 M

**Nota:** Los tratamientos con diferente letra a la izquierda son diferentes estadísticamente en su respuesta a la proteína retenida.

## A.2 Sorción isotérmica de proteína en función de la concentración de fosfatos.

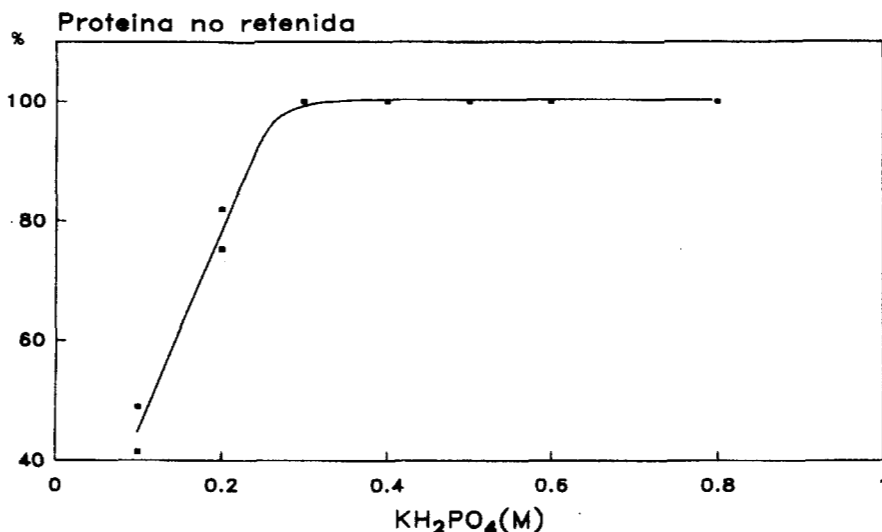


Fig. A.1 Curva de saturación de la resina con fosfatos.

Tratamiento: la resina se trató con diferentes concentraciones de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1h de exposición) y se cuantificó la proteína no retenida en la resina tratada (con el mismo tratamiento de la Tabla A.1).

Los resultados de A.1 y A.2 conducen a las condiciones del tratamiento de la resina con fosfatos: 1 h de exposición de la resina con una solución 0.5 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , en una relación 1:4.

## A.3 Retención de biomasa, glucosa y urea en la resina

A 1g de RS (tratada con fosfatos, Rp), se le adicionó 4 ml de suspensión de biomasa (2.5 g/l de micelio de *A. niger*) o solución de glucosa (1 g/l) o solución de urea (20 g/l), se mantuvo en contacto durante 3 h, se analizó el sobrenadante en su contenido de proteína con Lowry, de glucosa con DNS y de urea con Kjeldahl; y se comparó con un testigo (solución respectiva sin resina).

Los resultados mostraron que la biomasa, la glucosa y la urea no fueron retenidas en la resina tratada con fosfatos (Rp).

**A.4 Análisis preliminar de la interacción con aniones de una resina tratada con fosfatos, con nitratos o sulfatos.**

**Tabla A.2 Interacción de NaCl y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con la RPN y la RPS.**

Tratamiento	agregados	meq de sal/ gRS		%
		retenidos	en el sobrenadante	
RPN	0.055 NaCl	0.02 NaCl	0.030 NaCl 0.020 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.005 $\text{NaNO}_3$	36
RPN	0.055 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.055 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.000 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.020 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.030 NaCl 0.005 $\text{NaNO}_3$	100
RPS	0.03 $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.01 $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.020 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.002 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.010 NaCl	33
RPS	0.05 $\text{NaNO}_3$	0.05 $\text{NaNO}_3$	0.000 $\text{NaNO}_3$ 0.020 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.030 NaCl 0.001 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100

% es el porcentaje de retención

Tratamiento: a 1g de Rp se le agregó 4 ml de una solución de  $\text{NaNO}_3$  0.5 N, se mantuvo en contacto 1 h a 35 °C, dando origen a la RPN. El procedimiento anterior se repitió pero usando una solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 N, dando origen a la Rps.

**A.5 Efecto de la temperatura y de la concentración de sulfatos en el tratamiento de la resina, teniendo como variable de respuesta la adsorción de fosfatos**

Tabla A.3 Efecto de la temperatura y de la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en el tratamiento de la resina, teniendo como variable de respuesta la adsorción de fosfatos.

TRATAMIENTO		Adsorción	Desorción
Temperatura (°C)	meq $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /gRS	meq $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /gRS	meqNaCl/gRS
30	2.27	0.19	0.19
	4.23	0.13	0.13
	5.85	0.13	0.13
60	2.27	0.19	0.19
	4.23	0.13	0.13
	5.85	0.13	0.13
75	2.27	0.19	0.19
	4.23	0.13	0.13
	5.85	0.13	0.13

Tratamiento: 1gRS+4ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1h de exposición). Se lavó, se secó, se le añadió 0.88 meq de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /gRS (manteniéndose a 35 °C por 1h).

Los datos de la Tabla A.3 se analizaron con el paquete estadístico SAS mediante un ANOVA (modelo estadístico: la retención de iones fosfato depende de la temperatura y de la concentración de iones sulfato usadas durante el tratamiento de la resina), mostrando que la temperatura no tuvo influencia sobre el intercambio de sulfatos por cloruros y que lo único que afectó dicho intercambio son las diferentes concentraciones de sulfato que se manejaron durante el tratamiento.

## A.6 Tratamiento con citrato

Tabla A.4 Intercambio iónico de una resina tratada citrato.

	meq de sal / gRS			%
	agregados	retenidos	en el sobrenadante	
RC	0.05 NaCl	0.02 NaCl	0.03 NaCl 0.02 Citrato	40
RC	0.05 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.00 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.03 NaCl 0.02 Citrato	100
RC	0.05 NaNO <sub>3</sub>	0.05 NaNO <sub>3</sub>	0.00 NaNO <sub>3</sub> 0.03 NaCl 0.02 Citrato	100
RC	0.05 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.05 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.00 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.03 NaCl 0.02 Citrato	100
RC	0.56 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.43 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.13 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.29 NaCl 0.14 Citrato	77

% es el porcentaje de retención del ión analizado.

RC = resina tratada con 3.96 meq/gRS (1h a 35 °C). En cualquier solución agregada a la resina, se obtiene un pH final en el sobrenadante de 4.5

## A.7 Tratamiento con citrato y sulfato

Tabla A.5 Intercambio iónico de una resina tratada con citrato y sulfato.

	agregados	meq de sal / gRS		
		retenidos	en el sobrenadante, %	
RS	0.56 Citrato	0.55 Citrato	0.01 Citrato 0.37 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.18 NaCl	98
RCS	0.14 NaCl	0.02 NaCl	0.12 NaCl 0.02 Citrato	14
RCS	0.15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.11 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.04 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.09 NaCl 0.02 Citrato	73
RCS	0.14 NaNO <sub>3</sub>	0.14 NaNO <sub>3</sub>	0.00 NaNO <sub>3</sub> 0.12 NaCl 0.02 Citrato	100
RCS	0.18 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.13 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.05 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.13 Citrato	72

% es el porcentaje de retención del ión analizado.

RS = resina tratada con 4.2 meq/gRS de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, RCS = RC tratada con 4.2 meq/gRS de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Estos resultados mostraron que cuando un anión no estuvo contenido en la resina, fue adsorbido independientemente de su afinidad por ella. Además, el citrato es un anión muy afín a la resina y puede predecirse que si se produjera como consecuencia de desviaciones en el metabolismo de *A. niger* en las FES, el citrato sería atrapado rápidamente por los grupos amonio de la resina.

### A.8 Desorción de cloruros en la resina con iones hidróxido y sulfato.

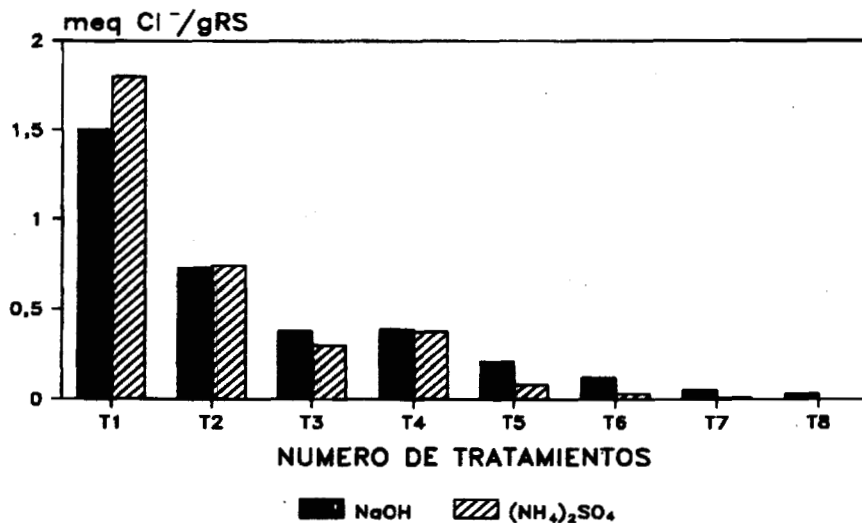


Fig. A.2. Desorción de cloruros en resinas tratadas con NaOH y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Nota: A 1g de resina húmeda (RH) se le agregó 2 ml de NaOH 3M o 2 ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.2 M, se mantuvo en contacto 1h a 35 °C, se filtró, se analizó el contenido de cloruros por HPLC (ver 3.7.5) y se le agregó solución nueva, el procedimiento se repitió hasta completar ocho tratamientos.

A medida que transcurrieron el número de tratamientos, la cantidad de cloruros fue disminuyendo, lo que significó que fue necesario aplicar a la resina varios tratamientos sucesivos (al menos cuatro) para eliminar a los iones cloruros que originalmente contenía y para saturarla con los nuevos iones del tratamiento. Además se encontró que la resina tiene una capacidad de intercambio iónico de 3.4 meq/gRS.

## ANEXO B

### Estimación de la biomasa

Los procedimientos para la construcción de las siguientes curvas se reportaron en el subcapítulo 3.9.

**B.1 Condiciones de concentración de ácido fosfórico y tiempo de reacción en la hidrólisis de micelio de *Aspergillus niger*.**

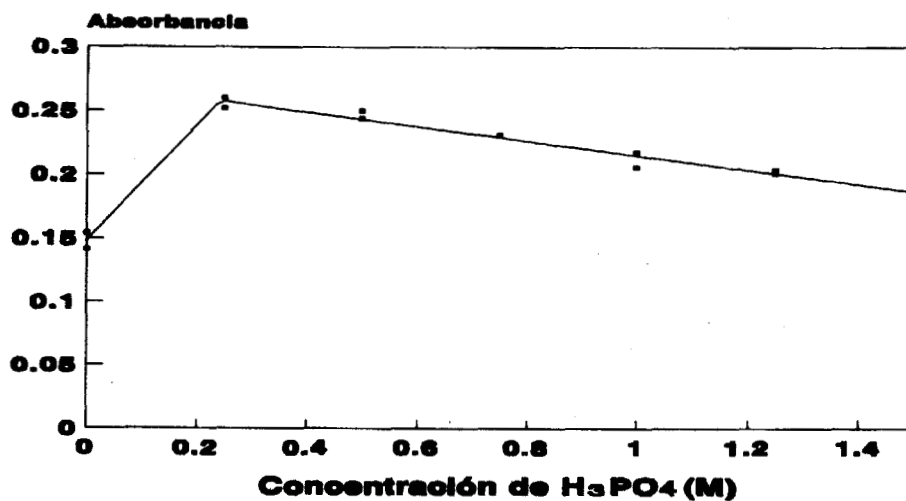


Fig. B.1a. Efecto de la concentración de  $H_3PO_4$  en la hidrólisis del micelio de *A. niger*, con un tiempo de hidrólisis de 5 min.

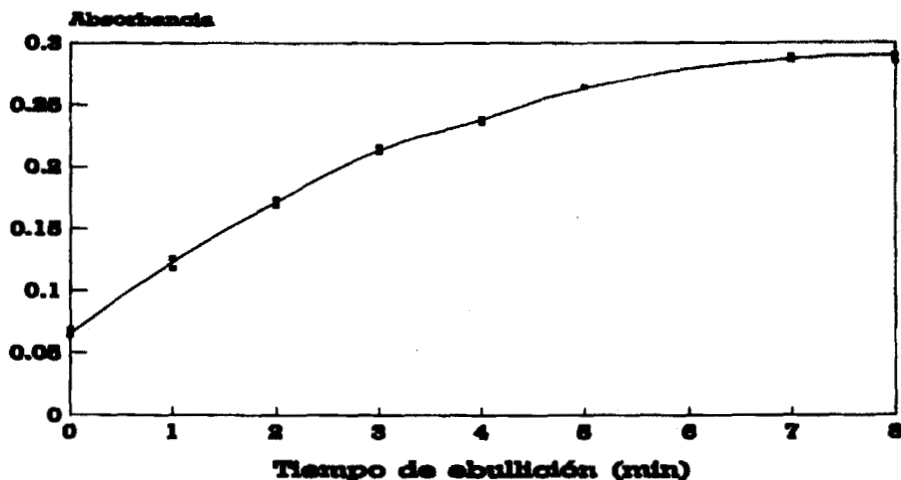


Fig. B.1b. Efecto del tiempo de reacción en la hidrólisis del micelio de *A. niger*, con una concentración fija de  $H_3PO_4$  0.25 M.

Nota: se empleó una suspensión de biomasa de 0.625 g/l, cultivada con 100 g de glucosa/l inicial.

## B.2 Interferencias del sistema de fermentación con el método del colorante ligado a la proteína y comparación entre la hidrólisis ácida y la hidrólisis alcalina.

Tabla B.1 Curvas para el estudio de las interferencias con el método del colorante ligado a las proteínas.

Curva	RS	Prot	NaOH	$H_3PO_4$	MC	Te
a		✓	✓			
b		✓	✓			✓
c	✓	✓	✓			✓
d	✓	✓	✓		✓	✓
A		✓		✓		
B		✓		✓		✓
C	✓	✓		✓		✓
D	✓	✓		✓	✓	✓

Donde Prot es la seroalbúmina bovina (0.6555 g/l); RS es la resina tratada seca (3.8.2); MC es el medio de cultivo (con 200 g/l de glucosa); y Te es un tiempo de reacción de 7 min a baño maría (agua a ebullición) para la hidrólisis ácida y 5 min para la alcalina.

Concentraciones finales en las curvas: Prot, de 0 a 109  $\mu\text{g/ml}$ ; MC, 0.15 ml/ml; RS, 0.1 g/ml; NaOH, 0.5 M o  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0.25 M. Se adicionó agua proporcionalmente para mantener en cada curva (por duplicado) el mismo volumen de líquido adicionado (10 ml/g RS - 4 ml/ g resina húmeda). Después de la hidrólisis, se centrifugó y se analizó como en la sección 3.9.1.

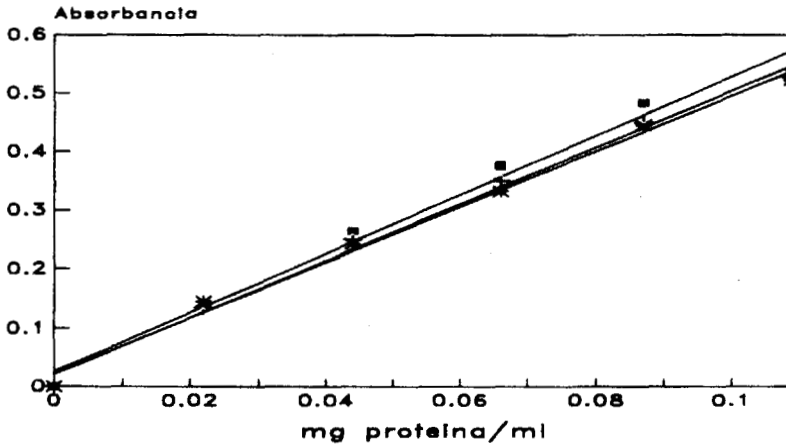


Fig. B.2 a. Curvas de seroalbúmina bovina con hidrólisis ácida, considerando los componentes del sistema de fermentación. Curvas: A (■), proteína y ácido; B (\*), proteína, ácido y calor; C (x), proteína, ácido, calor y resina; D (+), proteína, ácido, calor, resina y medio de cultivo.

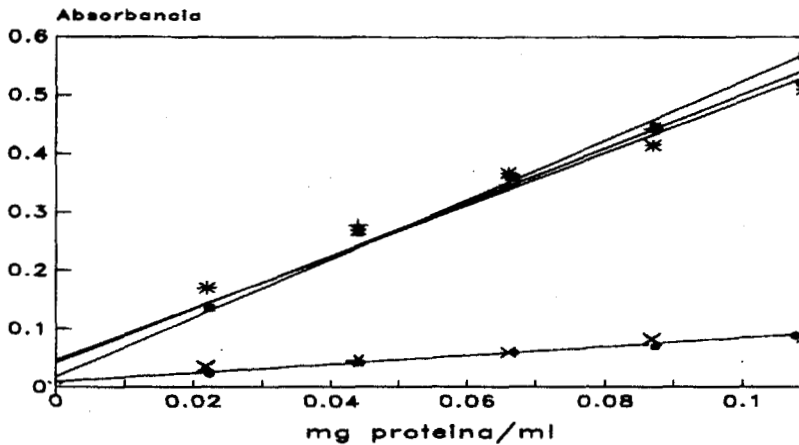


Fig. B.2 b. Curvas de seroalbúmina bovina con hidrólisis alcalina, compuesta de forma análoga a la fig. 6.2 a, pero usando álcali en lugar de ácido. a (+), b (\*), c (x), d (•). A (■) se retomó de la figura B.2 a.

**B.3 Efecto de la concentración inicial de glucosa en la composición de la biomasa y su respuesta con el método del colorante ligado a la proteína.**

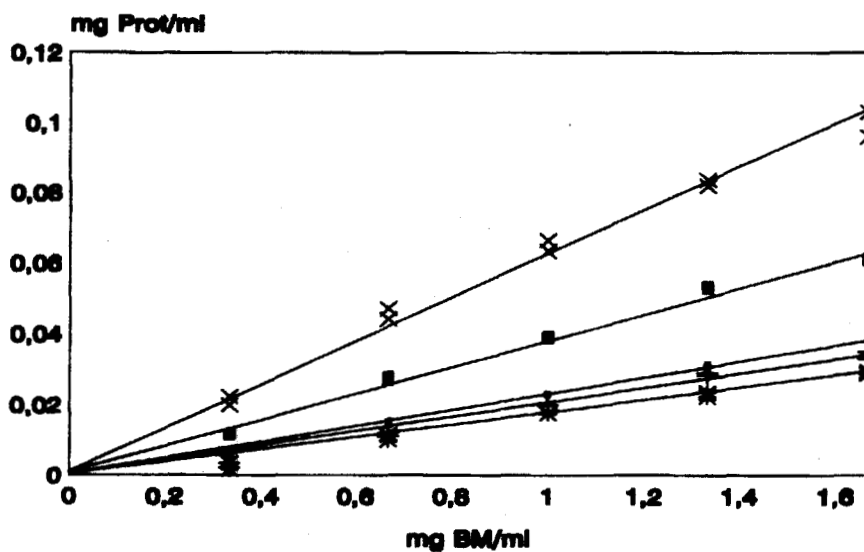


Fig. B.3 Respuesta en absorbancia del análisis de proteína en biomosas cultivadas a diferentes concentraciones de glucosa con el método del colorante ligado a la proteína. (\*) 50, (+) 100, (•) 200, (■) 300 y (X) 400 g/l.