



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Maestría en Ciencias con Orientación en
Biotecnología

**Efecto de una Fuente de Carbono Mixta sobre
la Producción de Ácido Giberélico en Cultivo
Sumergido con *Gibberella fujikuroi* bajo
Condiciones Limitadas de Nitrógeno**

TESIS

Que presenta

IBQ Danitsa Guadalupe Quijano Ortiz

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias con Orientación

en

Biotecnología Agroalimentaria

Directores de Tesis

Dra. Erika Yudit Rios Iribe

Dr. Oscar Martín Hernández Calderón

PRESENTACIÓN

La presente investigación, se llevó a cabo en los laboratorios del Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). Como Asesores Académicos participaron: Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno, Dr. Francisco Delgado Vargas, Dr. Roberto Gutiérrez Dorado, Dra. Erika Yudit Rios Iribe (Director de Tesis) y Dr. Oscar Martín Hernández Calderón (Director de Tesis). El desarrollo experimental se realizó en los Laboratorios de Patología, Biología Celular y Molecular, y de Biotecnología y Bioingeniería FCQB-UAS. Además, se requirió el uso de las instalaciones de los Laboratorios de Nutracéuticos y de Biocombustibles FCQB-UAS. Esta investigación recibió soporte económico del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEPE) – UAS [Apoyo a la Incorporación de Nuevos Profesores de Tiempo Completo - Oficio *PROMEPE/103.5/12/3360*, *FOLIO UAS-NPTC-059*] y del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) [Folios PROFAPI2013/158 y PROFAPI2014/175]. La alumna Danitsa Guadalupe Quijano Ortiz recibió Beca para Estudios de Posgrado (Estudios de Maestría 2013-2015) a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

DEDICATORIA

A todos los que han creído en mí, en especial a mi familia.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, a la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas y al Programa de Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología por ser parte de mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico proporcionado.

A la planta docente de la Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología por los conocimientos impartidos.

A mis directores de tesis Dra. Erika Yudit Rios Iribre y al Dr. Oscar Martín Hernández Calderón por aceptarme como parte de su equipo de investigación, por dirigir este trabajo de tesis, por brindarme de su tiempo y su amistad, y compartir de sus conocimientos y experiencia, mil gracias.

Al Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno, Dr. Francisco Delgado Vargas y Dr. Roberto Gutiérrez Dorado por colaborar en el comité de revisión de tesis, por escucharme y orientarme. Por su apoyo y disposición en todo momento.

A los laboratorios de Nutraceuticos, de Biología Molecular y Biocombustibles por permitirme el acceso a sus instalaciones y equipos para realizar parte de mi trabajo experimental.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería: Krisna, Gilberto, Ana Sofía, Alfredo, Nidia, Rosa y Adán por su apoyo y disposición en ayudar en todo momento y sobre todo por su amistad, mil gracias equipo Lince, los voy a extrañar.

A mi familia: mi papá Guillermo, mi mamá María del Refugio (†), mi tía Herminia, mi abuela Ramona y a mis hermanas Elizabeth, Lizeth, María Luisa y Rebeca por su amor y apoyo incondicional.

A mi novio Juan Alberto por su amor y apoyo incondicional.

A Dios por darme vida y salud para cumplir una meta profesional más.

ÍNDICE GENERAL

	Pág
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
I RESUMEN/ABSTRACT	1
II INTRODUCCIÓN	3
III REVISIÓN DE LITERATURA	5
A HISTORIA DE LAS GIBERELINAS	5
B EL COMPLEJO DE ESPECIES <i>Gibberella fujikuroi</i>	8
C PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LAS GIBERELINAS	9
1. Ácido giberélico (GA ₃)	12
D EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS GIBERELINAS	14
E USOS Y APLICACIONES DEL ÁCIDO GIBERÉLICO	17
F OBTENCIÓN DE GIBERELINAS	19
1. Síntesis química	19
2. Extracción de plantas	22
3. Cultivo microbiano	22
a Cultivo sumergido	23
G PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO	24
H RUTA BIOSINTÉTICA DE GIBERELINAS EN <i>Gibberella fujikuroi</i>	25
I ACETIL-CoA: NODO METABÓLICO COMÚN DE DISTINTOS METABOLITOS EN <i>Gibberella fujikuroi</i>	29
J MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE GIBERELINAS	32
K CULTIVO A NIVEL MATRAZ	33
1. Matraz con deflectores	33
L FACTORES NUTRICIONALES	35
1. Fuente de carbono	36
a Fuentes de carbono mixtas	36

2. Fuente de nitrógeno	38
a Regulación de nitrógeno de metabolitos secundarios fúngicos	40
3. Otros macronutrientes	41
4. Micronutrientes	41
M CONDICIONES DE CULTIVO DE <i>Gibberella fujikuroi</i>	44
N CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO	45
1. Fase de latencia	48
2. Fase de balance	48
3. Fase de transición	48
4. Fase de almacenamiento	49
5. Fase de mantenimiento (estacionaria)	49
6. Fase terminal	49
O EXPRESIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN HONGOS	49
1. Metabolitos secundarios	50
IV JUSTIFICACIÓN	53
V HIPÓTESIS	54
VI OBJETIVOS	55
A OBJETIVO GENERAL	55
B OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
VII MATERIALES Y MÉTODOS	56
A MATERIALES	56
1. Microorganismo	56
2. Conservación	56
3. Reactivos	56
B MÉTODOS	56
1. Medios de cultivo	56
a Agar dextrosa papa (PDA)	56

b Medio de propagación	58
c Medio de producción de ácido giberélico	59
2. Desarrollo del cultivo microbiano	59
3. Diseño de experimentos	61
4. Muestreo	61
5. Extracción y determinación de aceite	63
6. Determinación de biomasa	63
7. Determinación del sustrato residual	64
a Determinación de glucosa	65
b Determinación de nitrógeno	65
c Determinación de fosfatos	66
8. Extracción y determinación de ácido giberélico	66
VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
A CINÉTICA DE CRECIMIENTO	75
B CINÉTICA DE CONSUMO DE LA FUENTE DE CARBONO	77
C CINÉTICA DE CONSUMO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO	82
D CINÉTICA DE CONSUMO DE LA FUENTE DE FOSFATOS	84
E CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO	87
F ANÁLISIS CINÉTICO	93
IX CONCLUSIONES	105
X BIBLIOGRAFÍA	106
XI ANEXOS	117
Abreviaturas	126

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág
1	Clasificación taxonómica del hongo <i>Gibberella fujikuroi</i> .	10
2	Datos físicos y químicos de las giberelinas más importantes.	13
3	Aplicaciones del ácido giberélico.	20
4	Compañías productoras de ácido giberélico.	21
5	Funciones de los reguladores involucrados en el control del metabolismo secundario dependiente de nitrógeno.	42
6	Análisis de varianza para la producción de biomasa.	78
7	Análisis de varianza para la producción de ácido giberélico.	92
8	Parámetros de ajuste del modelo logístico para la cinética de producción de biomasa de todos los tratamientos.	94
9	Parámetros de ajuste del modelo logístico para la cinética de consumo de sustratos utilizando diferentes fuentes de carbono.	100
10	Curva de calibración para la determinación de glucosa.	121
11	Curva de calibración para la determinación de nitrógeno.	122
12	Curva de calibración para la determinación de fosfatos.	123
13	Datos de conversión de ácido giberélico a ácido giberelénico.	124
14	Curva de calibración para la determinación de ácido giberélico.	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig	Descripción	Pág
1	Síntomas de la enfermedad de <i>Bakanae</i> . A) super elongación de los tallos, B) adelgazamiento y decoloración de los tallos, C) granos de arroz vacíos, D) pudrición de la raíz y E) crecimiento algodonoso en la raíz.	6
2	Estructura de esqueleto tetracíclico <i>ent</i> -giberelano y algunas giberelinas importantes.	11
3	Modelo de la vía de señalización de las giberelinas en <i>Arabidopsis</i> .	16
4	Ruta metabólica y <i>cluster</i> de genes de la biosíntesis de giberelinas en <i>Fusarium fujikuroi</i> .	27
5	Ruta de isoprenoides y la biosíntesis de giberelinas en <i>Fusarium fujikuroi</i> .	28
6	Modelo de regulación del metabolismo secundario en <i>Fusarium fujikuroi</i> .	43
7	Curva característica de crecimiento y consumo de sustrato en un cultivo por lote: I) fase lag, II) fase de crecimiento acelerado, III) fase de crecimiento exponencial, IV) fase de crecimiento desacelerado, V) fase estacionaria y VI) fase de muerte.	46
8	Crecimiento macroscópico y microscópico del hongo <i>Gibberella fujikuroi</i> .	57
9	Estrategia general del bioproceso.	60
10	Matraz con deflectores y tapa de ventilación.	62
11	Cinéticas de producción de ácido giberélico y de consumo de la fuente de carbono en el medio donde se utilizó solo glucosa.	69
12	Cinéticas de producción de biomasa y ácido giberélico y cinéticas de consumo de los sustratos nitrógeno y fosfatos utilizando glucosa como fuente de carbono.	70
13	Cinéticas de producción de ácido giberélico y consumo de la fuente de carbono en el medio donde se utilizó solo aceite de maíz.	71

Fig	Descripción	Pág
14	Cinéticas de producción de biomasa y ácido giberélico y cinéticas de consumo de los sustratos nitrógeno y fosfatos utilizando aceite de maíz como fuente de carbono.	72
15	Cinéticas de producción de ácido giberélico y consumo de las fuentes de carbono en el medio donde se utilizó la mezcla glucosa-aceite de maíz en proporción 1:2.	73
16	Cinéticas de producción de biomasa y ácido giberélico y cinéticas de consumo de los sustratos nitrógeno y fosfatos utilizando fuente de carbono mixta glucosa-aceite de maíz proporción 1:2.	74
17	Cinéticas de crecimiento de <i>Gibberella fujikuroi</i> empleando diferentes fuentes de carbono [Barras corresponden al HSD (1.85319, $\alpha=0.05$) para comparación de medias correspondientes a las fuentes de carbono].	76
18	Cinéticas de consumo de la fuente de carbono durante la producción de ácido giberélico por <i>Gibberella fujikuroi</i> .	80
19	Cinéticas de consumo de la fuente de nitrógeno utilizando diferentes fuentes de carbono durante la producción de ácido giberélico por <i>Gibberella fujikuroi</i> .	83
20	Cinéticas de consumo de la fuente de fosfatos utilizando diferentes fuentes de carbono durante la producción de ácido giberélico por <i>Gibberella fujikuroi</i> .	86
21	Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de ácido giberélico [Barras corresponden al HSD (0.37856, $\alpha=0.05$) para comparación de medias correspondientes a las fuentes de carbono].	88
22	Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de sustrato usando glucosa como fuente de carbono.	96
23	Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de sustrato usando aceite de maíz como fuente de carbono.	97

Fig	Descripción	Pág
24	Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de los sustratos usando fuente mixta de carbono glucosa-aceite de maíz.	98
25	Simulación del crecimiento específico de biomasa y del consumo específico de sustratos para el tratamiento usando glucosa como fuente de carbono.	101
26	Simulación del crecimiento específico de biomasa y del consumo específico de sustratos para el tratamiento usando aceite de maíz como fuente de carbono.	102
27	Simulación del crecimiento específico de biomasa y del consumo específico de sustratos para el tratamiento usando fuente mixta de carbono glucosa-aceite de maíz.	103
28	Curva de calibración para la determinación de glucosa.	121
29	Curva de calibración para la determinación de nitrógeno.	122
30	Curva de calibración para la determinación de fosfatos.	123
31	Cinética de conversión de ácido giberélico a ácido giberelénico.	124
32	Curva de calibración para la determinación de ácido giberélico.	125

I RESUMEN

El ácido giberélico (GA_3) es el principal metabolito secundario producido por *Gibberella fujikuroi*, y es ampliamente utilizado en la agricultura y horticultura debido a la capacidad de promover y regular el crecimiento de plantas superiores. Diversas estrategias han sido implementadas para incrementar la producción de GA_3 , entre ellas el uso de fuentes mixtas de carbono. En esta investigación se realizó cultivo sumergido con *G. fujikuroi* H-984 en matraces Erlenmeyer con deflectores utilizando fuente de carbono en base a 40 g L^{-1} de C total, glucosa, aceite de maíz y fuente mixta en una proporción 1:2 (glucosa-aceite de maíz), bajo condiciones limitadas de nitrógeno, con el objetivo de revisar el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de GA_3 . Para comprender dicho efecto se determinaron las cinéticas de crecimiento y consumo de los sustratos glucosa, aceite, nitrógeno y fosfatos. Usando glucosa como única fuente de carbono se obtuvo la mayor concentración de biomasa (17 g L^{-1}), y produjo la menor concentración de GA_3 (380 mg L^{-1}) a las 144 h; en contraste, con aceite de maíz se obtuvo la más baja producción de biomasa (3 g L^{-1}) y una producción de GA_3 dos veces mayor que con solo glucosa (750 mg L^{-1}) a las 168 h del cultivo microbiano. La mezcla glucosa-aceite de maíz produjo la mayor producción de GA_3 a las 168 h (1154 mg L^{-1}) y una concentración de biomasa de 8.5 g L^{-1} . El uso de distintas fuentes de carbono afecta la concentración máxima de producción de GA_3 , siendo la estrategia de cultivo con fuente de carbono mixta glucosa-aceite de maíz, la mejor alternativa de producción de GA_3 , bajo estas condiciones de estudio.

ABSTRACT

Gibberellic acid (GA₃) is the main secondary metabolite produced by *Gibberella fujikuroi*, and it is widely used in agriculture and horticulture due to its ability to promote and regulate the growth of superior plant species. Several strategies have been implemented to increase the production of GA₃. Among them, is the use of mixed carbon sources. During the research a submerged culture was done with *G. fujikuroi* strain H-984 in Erlenmeyer deflector flasks, using a base carbon source of 40 g L⁻¹ of total carbon glucose, corn oil and mixed carbon source in a proportion of 1:2 (glucose-corn oil), under limited nitrogen conditions, with objective of revising the effect of the kinetics of growth and consumption of the substrates: glucose, oil, nitrogen, and phosphates. Using glucose as the only carbon source the highest concentration of biomass was achieved (17 g L⁻¹), this produced the lowest concentrations of GA₃ (380 mg L⁻¹) at 144 hours; in contrast, corn oil achieved lowest concentration of biomass (3 g L⁻¹) and a production of GA₃ twice as high than only glucose (750 mg L⁻¹) at 168 hours of the microbial culture. The mixed glucose-corn oil achieved the highest production the GA₃ at 168 hours (1154 g L⁻¹) and a biomass concentration of 8.5 g L⁻¹. The use of various carbon sources affects the maximum concentration of GA₃ production, been the mixed the carbon source: glucose-corn oil, the best alternative of GA₃ production, under the research conditions.

II INTRODUCCIÓN

Las giberelinas (GAs) son un grupo importante de fitohormonas que regulan los diferentes procesos de crecimiento y desarrollo de plantas superiores, siendo el principal representante el ácido giberélico (GA_3), producto principal de la ruta biosintética de las GAs durante el cultivo microbiano de *Gibberella fujikuroi*, el cual es único debido a las relativamente altas cantidades de GAs que puede secretar (Tudzynski, 1999), y es capaz de producir GA_3 en cantidades industriales (Oller-López y col., 2003). El GA_3 puede ejercer numerosas e importantes respuestas fisiológicas en diferentes etapas de desarrollo de las plantas superiores, como aceleración de la germinación, incremento de la velocidad de síntesis de enzimas, induce floración y alargamiento de tallos, siendo este último el efecto más notable (Bömke y Tudzynski, 2009). Por su capacidad para regular los procesos antes mencionados, las GAs han ganado interés a nivel mundial y son muy utilizadas en la agricultura, horticultura, viveros, cultivos de tejidos, viticultura, jardines de té y en la industria cervecera (Rodrigues y col., 2012). En los cultivos de *G. fujikuroi* las GAs fueron identificadas como metabolitos secundarios, se forman principalmente durante la fase estacionaria; el crecimiento exponencial de *G. fujikuroi* se detiene cuando el nitrógeno es limitante y se agota en el medio de cultivo, entonces sobreviene la formación de GA_3 (Borrow y col., 1964). Con el desarrollo de técnicas de secuenciación genética se comenzó a entender que la producción de ciertos metabolitos secundarios se relaciona con genes silenciosos que no pueden expresarse a causa de condiciones de cultivo inapropiadas, así la producción de metabolitos secundarios es fuertemente dependiente de las condiciones bajo las cuales se cultiva el hongo, por lo cual algunas estrategias desarrolladas para maximizar la productividad del metabolito fúngico se basan en modificar la composición del medio de cultivo o incluir la adición de precursores (Aparecida-Takahashi y col., 2013). El uso de aceites naturales como fuente de carbono para la producción de GA_3 se ha justificado debido a que podrían poseer precursores naturales para su biosíntesis, y está reportado que el uso de la mezcla glucosa-aceite de maíz tiene un efecto inductivo para la producción de GA_3 (Rios-Irribé y col., 2011), siendo la proporción 1:2 (glucosa: aceite de maíz) la que induce una mayor

concentración de GA₃ (Rios-Irribé y col., 2013). Continuando esta línea de investigación, recientemente nuestro grupo de trabajo probó tres distintas concentraciones de nitrógeno inorgánico (1, 1.5 y 2 g L⁻¹ de NH₄Cl) obteniendo la mayor producción de GA₃ con 1.5 g L⁻¹ de NH₄Cl (Martínez-Torres, 2014). En el presente proyecto, se investigó el efecto que ejercen distintas fuentes de carbono, glucosa, aceite de maíz y glucosa-aceite de maíz sobre la producción de ácido giberélico bajo condiciones limitadas de nitrógeno por cultivo sumergido con *G. fujikuroi* en matraces Erlenmeyer con deflectores y tapa de ventilación asegurando una mayor disponibilidad del oxígeno durante el bioproceso lo cual es importante para asegurar una mayor productividad de GA₃ debido al metabolismo aerobio del microorganismo. Además la modelación matemática de las cinéticas permitió determinar parámetros difíciles de cuantificar experimentalmente como lo son crecimiento específico y el consumo específico, los cuales revelan información importante sobre el comportamiento metabólico del microorganismo.

III REVISIÓN DE LA LITERATURA

A. HISTORIA DE LAS GIBERELINAS

El descubrimiento de las giberelinas se remonta a la investigación sobre las causas de una enfermedad que se presentaba en las plantas de arroz conocida como “*Bakanae*” o enfermedad de “la plántula tonta”, ampliamente extendida en Asia e identificada en el Japón (con diferentes nombres tales como *Ahoine*, *Somen nae*, *Naganae*, *Yarinae*, *Oyataka*, *Otokonae* y *Onanae*)(Kumar y Losane, 1989), cuyos síntomas son (**Fig 1**): super elongación (A), adelgazamiento y decoloración de los tallos (B); producción de granos estériles (C) debido a que se generan vacíos; pudrición y crecimiento algodonoso en la raíz (D y E). Debido al crecimiento descontrolado, la planta moría rápidamente ocasionando pérdidas de las cosechas hasta de un 40 %.

En 1898, Hori aisló un hongo de las plantas de arroz enfermas el cual provocaba un crecimiento anormal de los germinados de arroz al penetrar por las raíces y la base del tallo de las plantas, extendiéndose por los tejidos y hojas, e induciendo en los tallos un alargamiento más rápido que en las plantas sanas (Uscanga-Reynell, 1992). El patólogo Sawada en 1917 identificó al hongo, en cuyo estado imperfecto le denominó *Fusarium moniliforme*, mientras que al estado perfecto sexual le llamó *Gibberella fujikuroi* (Brückner y Blechs Schmidt, 1991a).

Entre los años 1926 y 1940 había más de 50 publicaciones relacionadas con las propiedades químicas y biológicas de la “toxina” producida por el hongo. En 1926, Kurosawa demostró que todos los síntomas de la enfermedad de *Bakanae* eran provocados por una sustancia secretada por el hongo, esto como resultado de poder reproducir los síntomas de la enfermedad mediante la aplicación de filtrados del medio de cultivo estéril exento del hongo a plantíos sanos. Yabuta y Sumiki en 1938 aislaron una sustancia cristalina del medio de cultivo filtrado y posteriormente obtuvieron extractos que poseían una actividad biológica más alta que denominaron ácido fusárico y posteriormente fue nombrado como giberelina en alusión al microorganismo que la produce. A partir de los experimentos con estos filtrados, Yabuta y Sumiki (1938) reportaron el aislamiento de dos sustancias cristalinas, las giberelinas A y B, ambas sustancias eran biológicamente activas pero tenían



Fig 1. Síntomas de la enfermedad de *Bakanae*. A) super elongación de los tallos, B) adelgazamiento y decoloración de los tallos, C) granos de arroz vacíos, D) pudrición de la raíz y E) crecimiento algodonoso en la raíz.

diferentes propiedades químicas.

Fue hasta 1950 cuando en el occidente se tuvo conocimiento de los experimentos de los japoneses. Los primeros trabajos realizados fueron en los Estados Unidos. Realizaron estudios de cultivo microbiano y encontraron una giberelina con la misma fórmula molecular que tenía propiedades diferentes a la giberelina A y a la cual llamaron giberelina X. Stodola y col. en 1955 desarrollaron métodos para la producción y purificación de las giberelinas A y X.

En Inglaterra en 1954 Curtis y Cross, independientemente de los trabajos norteamericanos, anunciaron la producción de ácido giberélico en medios de Raulin-Thom, usando sacarosa como fuente de carbono y señalaron la existencia de tres productos del metabolismo del hongo las giberelina A, B y ácido giberélico (Uscanga-Reynell, 1992).

Grove en 1954 notando la gran similitud que existía entre la giberelina "X" y la nueva giberelina aislada por los ingleses propuso una comparación para establecer su identidad e investigar si eran las mismas giberelinas. Así comprobó que los ésteres metílicos en el espectro infrarrojo, la rotación específica, el punto de fusión y el peso molecular, correspondían uno a otro. A esta nueva giberelina se le denominó ácido giberélico por los investigadores ingleses y la denominación fue aceptada también por los norteamericanos (Uscanga-Reynell, 1992).

Los primeros ensayos de producción de estos compuestos se efectuaron por investigadores japoneses en cultivos estacionarios, obteniéndose bajos rendimientos (40-60 mg L⁻¹) en periodos largos de incubación (7-10 días) (Jefferys, 1970). Sin embargo, en experimentos realizados en matraces agitados con el mismo medio, se obtuvo una concentración de GA₃ de 200 mg L⁻¹. En 1954, la compañía "Imperial Chemical Industries" (ICI) inició la producción de giberelinas de manera comercial a escala de laboratorio utilizando *G. fujikuroi*. Para este propósito se usaron técnicas por cultivo en lote.

En 1956, West y Phinney descubrieron que extractos de plantas superiores contenían sustancias que producían efectos similares a los del ácido giberélico, presentando así la primera evidencia de la presencia de esta hormona en plantas superiores. A partir de este hecho se incrementó el interés por el estudio de las

giberelinas y se han realizados numeroso estudios sobre su estructura química, mecanismos de regulación y efectos en plantas.

En los años 60, una serie de estudios se han realizado sobre la aplicación de GAs en diversas plantas, aves, animales y microorganismos. Además, se llevaron a cabo los primeros experimentos que muestran su síntesis en el laboratorio. Desde entonces, varias técnicas de producción se han desarrollado con el fin de hacer el proceso más reproducible y económicamente viable (Uscanga-Reynell, 1992).

Paleg hizo una revisión en 1965, y encontró que el número de giberelinas conocidas eran solamente 13. Este número se incrementó rápidamente a 29 giberelinas conocidas en sólo 5 años. En 1984, se reportaron 62 giberelinas individuales, de las cuales 25 de ellas se aislaron a partir de los caldos de cultivo del hongo *G. fujikuroi*, 52 a partir de plantas superiores y 14 eran comunes en ambas fuentes. Actualmente se conocen un gran número de actinomicetos y levaduras así como algunas bacterias que producen giberelinas, pero solamente nueve cultivos provocan efectos en las plantas, no obstante, sólo *G. fujikuroi* produce GA₃ en altas concentraciones (Kumar y Lonsane, 1989; Almanza-Rangel, 2005).

Como resultados de estas propiedades y sus aplicaciones comerciales desde la mitad del siglo pasado, las GAs han sido objeto de diversos estudios. El enorme interés biotecnológico en la producción de GA₃ impulsó el estudio de la vía biosintética de las GAs y se han realizado investigaciones bioquímicas, genéticas e ingenieriles para optimizar la producción de GA₃ (Uscanga-Reynell, 1992).

B. EL COMPLEJO DE ESPECIES *Gibberella fujikuroi*

El hongo *G. fujikuroi* actualmente ha sido renombrado como *Fusarium fujikuroi*, el cual es un hongo filamentoso perteneciente al grupo de los ascomicetos (Shukla y col., 2005b). Es una especie pleomórfica, ya que puede tener una o más formas en sus estados sexuales (perfecta) como en los asexuales (imperfecto) (Cuali-Álvarez y col., 2011). El complejo *G. fujikuroi* está conformado por un gran grupo de especies de *Fusarium* con origen monofilético. Incluye importantes patógenos fúngicos de diversos cultivos, como el maíz, el arroz, la cebada, caña de azúcar, el pino, el mango, la piña, el sorgo y muchos más (Bömke y Tudzynski, 2009).

Además, los miembros de estas poblaciones de apareamiento pueden encontrarse preferentemente en plantas hospederas específicas, y difieren en su capacidad de producir metabolitos secundarios, tales como las fumonisinas, ácido fusárico, beauvericina, fusaproliferina, moniliformina, fusarinas, y GAs. En algunos casos, las cepas de más de una especie pueden producir un metabolito secundario particular, mientras que en otros casos esta capacidad parece ser específica de la especie. La capacidad para producir GAs sigue siendo la marca comercial de *F. fujikuroi*, ya que se limita sólo a algunas especies de hongos (Bömke y Tudzynski, 2009).

Escamilla-Silva y col. (1999) probaron seis diferentes cepas de *G. fujikuroi*, seleccionando la cepa H-984 como la mejor para la producción de ácido giberélico. Esta cepa presenta microconidias en forma de bastos, apiculadas, se encuentran asiladas y en ocasiones en cadenas de 3 a 4 conidias. No presenta macroconidias. Tiene una capacidad de esporulación moderada, ya que la producción de conidias se observa solo en algunos caldos nutritivos, mientras que en otros la producción de conidias es negativa no dando resultados para los medios de cultivo convencionales.

La morfología macroscópica de *G. fujikuroi* corresponde a un hongo de aspecto aterciopelado y veloso debido a la formación de microconidias. Las microconidias son paredes delgadas, fusiformes, con ligera curvatura apical, miden de 25 a 60 µm de largo y pueden presentar de 3 a 7 septos. Taxonómicamente, el hongo queda clasificado como se muestra en el **Cuadro 1**. El micelio aéreo tiene una coloración blanca mientras que en el micelio vegetativo se desarrollan pigmentos violetas de diferentes intensidades y en algunos casos incoloros. Presenta un crecimiento radial rápido (de 1.0 a 1.3 cm de diámetro por día). La morfología microscópica corresponde a un hongo filamentoso con micelio macrosifonado, septado y halino (Uscanga-Reynell, 1992; Escamilla-Silva y col., 1999).

C. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LAS GIBERELINAS

Las GAs constituyen una extensa familia de ácidos diterpénicos tetracíclicos, tienen como estructura química base al *ent*-giberelano (**Fig 2**), compuesto por 19 o 20 átomos de carbono agrupados en un sistema de 4 o 5 anillos y se caracterizan por una diversidad estructural resultante de hidroxilaciones-oxidaciones, contracción de

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del hongo *Gibberella fujikuroi*

Reino	Hongos
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordarionycetes
Subclase	Hypocremycetidae
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Género	<i>Gibberella, Fusarium</i>
Especie	<i>fujikuroi</i>

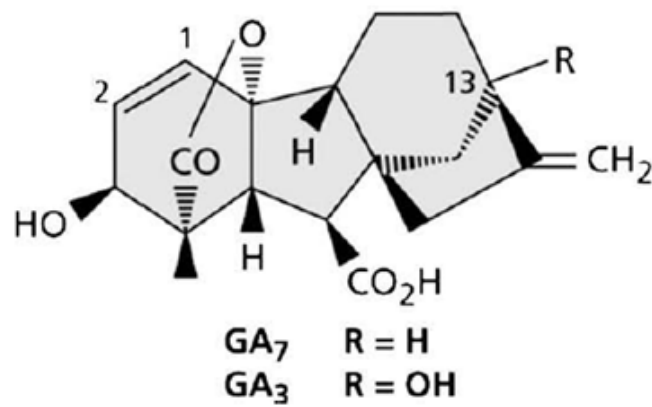
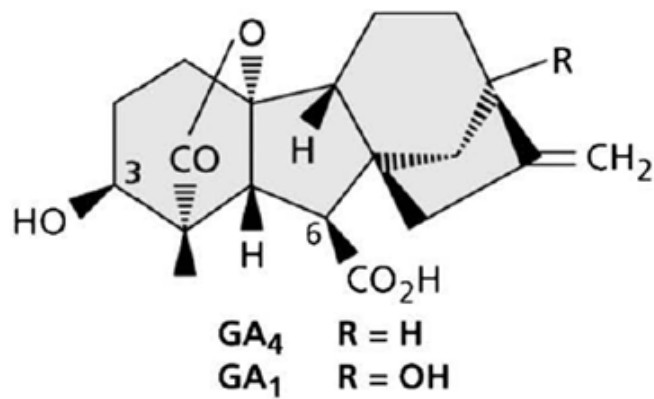
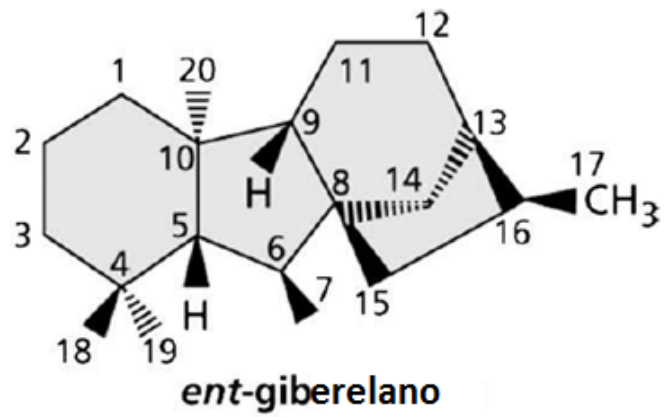


Fig 2. Estructura del esqueleto tetracíclico *ent*-giberelano y algunas giberelinas importantes.

Bömke y Tudzynski, 2009.

anillos y la presencia de muchos grupos funcionales. Con las técnicas analíticas modernas se han logrado identificar un total de 136 GAs (Bömke y Tudzynski, 2009; Rodrigues y col., 2012), aisladas a partir de plantas superiores, producidas por microorganismos como bacterias y hongos u obtenidas sintéticamente (Brückner y Blechschmidt, 1991a; Tudzynski, 1999; Karakoc y Aksöz, 2006; Rodrigues y col., 2012). Las giberelinas son designadas como GA_n donde “n” indica el orden como fueron descubiertas (GA₁ a GA₁₃₆).

De acuerdo a su estructura las GAs pueden ser clasificadas en dos grupos:

- ✓ Giberelinas C₂₀: poseen completamente la estructura diterpenoide con 20 átomos de carbono.
- ✓ Giberelinas C₁₉: perdieron biosintéticamente el átomo del carbono 20 y se caracterizan por tener una alta actividad biológica (Kumar y Lonsane, 1989). Dentro de las giberelinas C₁₉ se encuentran la GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇.

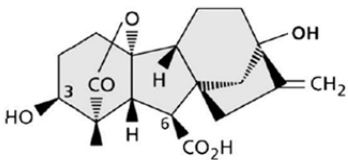
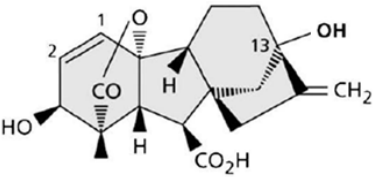
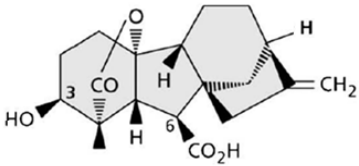
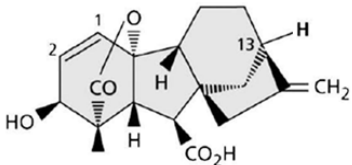
En el **Cuadro 2** se muestran datos físicos y químicos de las GAs biológicamente más activas.

Dentro de las giberelinas, la más predominante y representativa es el ácido giberélico (GA₃) por su alta actividad biológica en las plantas y su abundancia en cultivo microbiano. Las giberelinas GA₁, GA₄ y GA₇ también son biológicamente activas y son importantes debido a que son precursores inmediatos en la biosíntesis del GA₃ por lo que generalmente están presentes en los medios de cultivo acompañando al GA₃ (Kumar y Lonsane, 1989; Brückner y Blechschmidt, 1991b).

1. Ácido giberélico (GA₃)

El GA₃, químicamente es un ácido γ-dihidroxi lactónico tetracíclico que contiene dos enlaces de etileno y un grupo de ácido carboxílico libre. Su estructura química C₁₉H₂₂O₆ se presentó en la **Fig 2**. Es un sólido amorfo cristalino, incoloro con un punto de fusión de 234-236 °C y una rotación óptica de +92° en alcohol etílico (Brückner y Blechschmidt, 1991a). Es soluble en agua hasta 5 g L⁻¹ y soluble en solventes orgánicos como etanol, metanol, acetona, acetato de butilo y acetato de etilo, moderadamente soluble en éter, y difícilmente soluble en cloroformo, tetracloruro de carbono y éter de petróleo. Se caracteriza por un intenso color azul y una fuerte fluorescencia con la adición de ácido sulfúrico. Es estable en estado sólido

Cuadro 2. Datos físicos y químicos de las giberelinas más importantes

Giberelina	Fórmula	Estructura	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Punto de fusión (°C)	Rotación óptica (α) _D ²⁰
GA ₁	C ₁₉ H ₂₄ O ₆		348	255-258	+38°
GA ₃	C ₁₉ H ₂₂ O ₆		346	234-236	+92°
GA ₄	C ₁₉ H ₂₄ O ₅		332	214-216	-3°
GA ₇	C ₁₉ H ₂₂ O ₅		330	169-172	+20°

Brückner y Blechschmidt, 1991a

y seco e inestable en soluciones acuosas, contienen un anillo lactona (lo que lo hace inestable) que al abrirse forma ácido giberelénico que no cuenta con actividad biológica. Su descomposición es acelerada a altas temperaturas, la vida media del ácido giberélico en soluciones acuosas es de 14 días a 20 °C y 2 h a 50 °C. En soluciones acuosas, el GA₃ presenta su mayor estabilidad en un rango de pH entre 3 y 4 (Brücker y Blechschmidt, 1991a), es un ácido monobásico y reporta pK en agua de 4 y de 4.1 en solución acuosa amortiguada. El GA₃ puede sufrir procesos de degradación que juegan un papel muy importante durante el bioproceso como en el proceso de recuperación. El GA₃ es el compuesto menos estable entre todas las giberelinas. A temperatura ambiente, el GA₃ en solución acuosa se descompone en ácido giberelénico e iso-GA₃ (Uscanga-Reynell, 1992).

Alteraciones en el pH pueden llevar a transformaciones irreversibles a ácido giberélico, ácido alogiberélico, ácido iso-giberélico y ácido giberelénico. Este último, es el producto estable de la hidrólisis química ácida del GA₃ (Holbrook y col., 1961; Berríos y col., 2004). Todos los compuestos producidos durante la degradación del GA₃ son moléculas biológicamente inactivas.

D. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS GIBERELINAS

Las giberelinas están presentes en pequeñas cantidades en las plantas en concentraciones de 0.01 a 1 mg de GA₃ por kg de peso seco. Estudios sobre la interacción entre las giberelinas y los tejidos de las plantas indican que afectan a casi todos los órganos y partes de la planta, hojas, pecíolos, flores, y frutos. El principal efecto de las giberelinas es la estimulación del crecimiento, provocando alargamiento de los tallos de las plantas. Además, inducen la producción de amilasas, promueven el rompimiento del letargo de la germinación de las semillas y yemas; así como la floración bajo condiciones no propicias en plantas normalmente consideradas muy jóvenes para la producción de flores y el desarrollo de frutos (Kumar y Losane, 1989; Negrete-Rodríguez, 2002).

El efecto difiere en cada tipo de planta que se trata, si son vegetales, cereales o de frutos, por lo que no se puede generalizar la concentración, el tiempo de tratamiento y la etapa de aplicación. Se usa generalmente en concentraciones de

0.01 a 10 mg L⁻¹. Generalmente, se realizan aplicaciones tópicas, además se utiliza la inmersión de tubérculos, bulbos, raíces o semillas. También se aplica en forma de pequeñas gotitas sobre las yemas en crecimiento (Negrete-Rodríguez, 2002).

La producción de giberelinas se da principalmente en las hojas de las plantas posteriormente son trasladadas por el floema al resto de la planta, las raíces también producen giberelinas y se han encontrado altos niveles de giberelinas en semillas inmaduras (Arias de la Torre, 2014).

Bömke y Tudzynski (2009) reportan un modelo de la vía de señalización de GAs en *Arabidopsis*. La **Fig 3** muestra que en ausencia de GAs bioactivas, la ubiquitina ligasa SCF^{SLY1} E3 no puede interactuar con proteínas DELLA (reguladores negativos de la señalización de las GAs). Por lo tanto, las proteínas DELLA persisten en células y reprimen las respuestas de las GAs, tales como la germinación de semillas, elongación del tallo, y la floración. En presencia de GAs bioactivas, GID1 se une en el núcleo y/o citoplasma. Si se produce la unión en el citoplasma, el complejo GID1-GAs probablemente se transfiere al núcleo para unirse a las proteínas DELLA localizadas en el núcleo. Una vez que la proteína se une a DELLA GID1-GAs, el complejo SCF reconoce y ubiquitina a la proteína DELLA. Las proteínas DELLA ubiquitinadas son degradadas por el proteosoma 26S, para que se produzca la acción de las GAs.

Es más notable la acción de las giberelinas en plantas enanas como chícharos y en algunas variedades de maíz enano, que crecen hasta tomar una altura normal. La aplicación a este tipo de plantas es un método para determinar biológicamente el efecto de las giberelinas. El gen único de los mutantes enanos que reaccionan específicamente con las giberelinas son los más útiles en los bioanálisis. Los fenómenos que provocan estas acciones en las plantas son debidos a un incremento en la división celular, el incremento en el número de raíces, expansión celular y estimulación de enzimas hidrolíticas (Negrete-Rodríguez, 2002).

En 1956, Lang fue el primero que demostró que las plantas de fotoperiodo largo y que requieren de temperaturas frías como son las espinacas, la lechuga, zanahorias, la col y el nabo, pueden ser inducidas a formar flores por la aplicación de giberelinas.

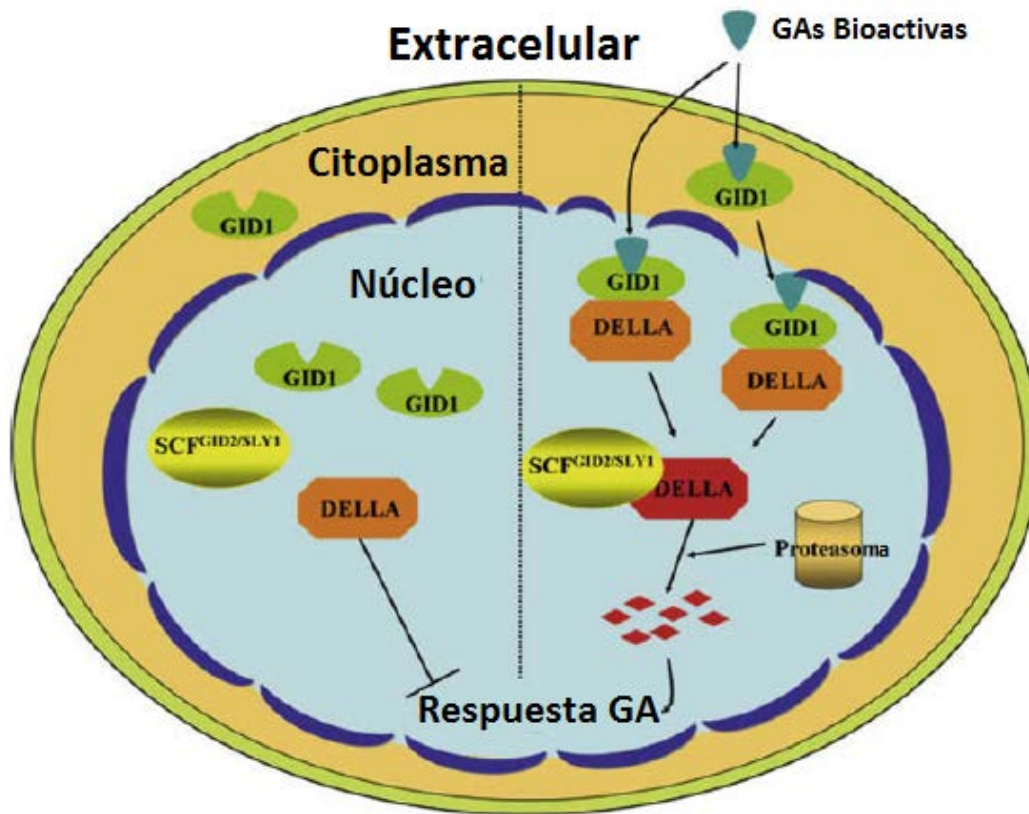


Fig 3. Modelo de la vía de señalización de las giberelinas en *Arabidopsis*.
Bömke y Tudzynski, 2009.

Las GAs también controlan la expresión sexual de algunas plantas, manteniendo las líneas paternas en la producción de semillas híbridas, con lo que resultan de gran utilidad para los productores de semillas. Además estimulan el crecimiento en los internodios más jóvenes y frecuentemente incrementan la longitud de los internodios individuales. Al aplicar GAs sobre los tallos de las plantas se incrementa notablemente la división en el meristemo subapical y provoca el crecimiento rápido de muchas plantas arrojadas. Solamente la tercera parte de las giberelinas que existen en la naturaleza son fisiológicamente activas en plantas (Kumar y Lonsane, 1989; Negrete-Rodríguez, 2002; Almanza-Rangel, 2005). Mientras que Weaver (1976), explica que el incremento de la síntesis de enzimas aumenta el potencial osmótico, ocurriendo entonces un flujo de agua hacia el interior de la célula, el cual produce un aumento en tamaño. Según Turner, 1972, postula que las aplicaciones de GA₃ aumentan los contenidos de ARN, y por consiguiente aumenta la síntesis de enzimas como amilasas, proteasas y celulasas (Arias de la Torre, 2014). Para Hartmann y Kester (1997), las giberelinas cumplen su función en dos etapas; la primera se cumple en la etapa inicial de inducción de enzimas al ser transcritas de los cromosomas, la segunda etapa consiste en la activación de enzimas que intervienen en la movilización del sistema de alimentos (Cruz-Sancán, 2002).

E. USOS Y APLICACIONES DEL GA₃

El ácido giberélico actúa como una hormona endógena de plantas superiores por lo que tiene gran importancia económica e industrial debido a que controla muchos procesos del desarrollo de estas, y está ganando gran atención en todo el mundo debido a su uso efectivo en la agricultura, viveros, cultivos de tejidos, jardines de té, o mejoramiento de plantas para aumentar el rendimientos de los cultivos, la biomasa vegetal, el tamaño del fruto, inducción de la floración, o para influir en el desarrollo de la planta (Rodrigues y col., 2012; Albermann y col., 2013).

El principal uso del GA₃, es el agroquímico con un 90 %, como reactivo analítico un uso de 9 % y en el malteo de la cebada con 1 % (Patiño, 1995). Comercialmente se aplica el GA₃ y la mezcla de las giberelinas GA₄/GA₇. Las aplicaciones deben

realizarse en el momento adecuado y con una concentración apropiada. Algunas aplicaciones son las siguientes:

Producción de frutos: Uno de los principales usos del GA₃ es aumentar el tamaño de las uvas sin semilla (uvas Thompson Seedles, un cultivar de *Vitis vinifera*). Debido al reducido tamaño de los tallos de las uvas sin semilla, los racimos de uva están demasiado compactos y se reduce el crecimiento de los frutos. Las GAs estimulan la elongación del tallo, permitiendo a las uvas hacerse más grandes al evitar la compactación, y al encontrarse menos apretadas son menos susceptibles a infecciones por hongos. Usualmente, las plantas se rocían dos veces, una en la floración y otra cuando se forman los frutos (Arias de la Torre, 2014). También se han rociado GAs sobre hojas y frutos de árboles de naranja California (*Citrus aurantium*), cuando los frutos han perdido casi todo su color verde, para impedir varios trastornos de la cáscara que aparecen durante su almacenamiento. En este caso las hormonas retrasan la senescencia y mantienen más firmes las cáscaras del fruto. En la horticultura se utiliza para cultivos de alcachofas, apio, espinaca, lechuga.

Aumento en la producción de la caña de azúcar: La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una de las pocas plantas que almacena sus carbohidratos en forma de azúcar (sacarosa), en lugar de almidón. Originaria de Nueva Guinea, la caña de azúcar es una herbácea perenne que puede alcanzar una altura entre 4 y 6 m. La sacarosa es almacenada en las vacuolas de las células del parénquima de los entrenudos. El tratamiento con GA₃ puede aumentar el rendimiento de la caña hasta 20 toneladas por hectárea y la producción de azúcar alrededor de 2 toneladas por hectárea. Este incremento es el resultado de la estimulación de la elongación de los entrenudos durante el invierno.

Elaboración de malta de cebada: Este proceso es la primera etapa en el proceso de elaboración de cerveza. Durante la elaboración de la malta, se produce la germinación de las semillas de cebada (*Hordeum vulgare*) a temperaturas que maximizan la producción de enzimas hidrolíticas por la capa de aleurona. Algunas veces se utiliza el GA₃ para aumentar la velocidad del proceso de elaboración de malta. Si adicionan de 25-500 µg por kg de cebada de GA₃ se pueden ahorrar de 2 a 3 días durante el malteado de la cebada (Monteiro-Machado y Soccol, 2007).

En el **Cuadro 3** se muestran otras aplicaciones y efectos del ácido giberélico en la agricultura y horticultura.

El costo de GA₃ ha restringido su aplicación en el crecimiento y desarrollo de plantas, excepto para ciertas plantas de alto valor comercial (Shukla y col., 2005b; Karakoc y Aksöz, 2006; Rodrigues y col., 2012). Existen algunas causas por las cuales el uso del GA₃ es limitado:

- ✓ Tiene un alto valor en el mercado internacional, alrededor de 40 USD/g.
- ✓ El GA₃ requiere de periodos más grandes para observar sus efectos en comparación con los fertilizantes. El tiempo ideal y las concentraciones óptimas aún no son completamente conocidas por lo que puede provocar efectos no deseados; sabiéndose de su poder regulatorio, las aplicaciones de muy bajas concentraciones pueden resultar en profundos efectos, mientras que muy altas pueden dar el efecto opuesto.
- ✓ La presencia de cantidades diluidas de producto en cultivo sumergido ha sido reconocida como un obstáculo importante en la producción económica de GA₃, principalmente debido a los incrementos de costos de procesamiento y disposición de las aguas residuales durante la purificación. Además, el elevado costo de la separación de las células microbianas a partir de caldo de cultivo microbiano (Rodrigues y col., 2012).

El ácido giberélico que se utiliza actualmente en México es importado de Estados Unidos, Reino Unido y China. En el **Cuadro 4** se citan algunas de las compañías productoras de ácido giberélico y la marca comercial del producto hasta agosto de 2012.

F OBTENCIÓN DE GIBERELINAS

Existen tres métodos para la obtención de GAs:

1. Síntesis química

Es un proceso muy costoso, requiere muchas etapas que involucran reactivos muy caros y cada etapa varía el rendimiento por lo que los costos por éste método son mayores que en la producción por cultivo microbiano (Kumar y Lonsane, 1989). Las GAs obtenidas por esta vía se destinan principalmente a la investigación.

Cuadro 3. Aplicaciones del ácido giberélico

Aplicaciones	Efecto
Restauración de las alteraciones metabólicas resultantes del estrés salino en las semillas de lino	Incremento de la altura de la planta, número de ramas, número de hojas, área foliar, peso fresco y seco.
Desarrollo vegetativo de fresa 'Chandler'	Influye en la altura de la corona, corona de propagación, longitud del pecíolo, número de hojas y el área foliar.
Efecto en la polinización de la mandarina cv. Clementina para obtener frutos sin semillas	Afecta a la fertilización actuando en la ovulación en condiciones de polinización cruzada.
Plantas de maíz	Invierte los efectos del estrés salino.
Semillas de guisante enano	Estimulan el crecimiento de brotes.
Semilla de cactus (<i>Trichocereus terscheckii</i>)	Promueve la germinación de la semilla en luz blanca y oscuridad.
Tubérculos de papa	Promueve la multiplicación y la elongación celular, y la interrupción de la dormancia.
Melocotones y nectarinas	Inhibe la floración.
Fruta Lichi "Yu Her Pau"	Aumenta el peso de la fruta.
Maracuyá (<i>Passiflora nítida</i>) Khunt	Tiene un efecto sobre la germinación - interrupción de la dormancia.
Frutas uvas	Puede aumentar la masa y el número de bayas, reduce el número de semillas.
Limón ácido "Tahiti"	Tiene un efecto sobre la floración y fijación de la fruta.
Naranja	Control de cosecha.
Malta	Puede mejorar el proceso de malteado y reducir la cantidad de tiempo requerido para el proceso.
Semillas	Se puede superar la dormancia.
Caña de azúcar	Puede mejorar la productividad.
Infección de la hoja de la papa por <i>P. infestans</i>	Actúa sobre la inhibición de los esporangiosporos del parásito.

Cuadro 4. Compañías productoras de ácido giberélico

Empresa	Producto	Ingrediente activo (pureza)
Bayer Cropscience S. A	Progibb 10 S. P.	Ácido giberélico (90 %)
Sumitomo Corporation Colombia S. A.	Activol	Giberelina A3 (9.40 %)
Quimor S. A.	Magiber WP	Ácido giberélico (20 %)
Valent Biosciences S. A.	Ryzup SL	Ácido giberélico (4 %)
Jaime Ortiz Barrera & CIA LTDA	Ácido giberélico job	Ácido giberélico (10 g kg ⁻¹)

Valdovinos-García, 2014

2. Extracción de plantas

Las plantas superiores contienen en su mayor parte GAs unidas y pequeñas cantidades de GAs libres. Las GAs unidas son altamente polares en comparación con las GAs libres. El proceso de extracción de GAs de los tejidos de las plantas es por una maceración suave utilizando metanol, y la subsiguiente partición de GAs libres con acetato de etilo a un pH de 2.5. La cantidad de GAs que se encuentra en las partes vegetativas de las plantas son generalmente muy bajas (concentraciones de $\mu\text{g kg}^{-1}$ de planta fresca) en comparación con sus partes reproductoras, tal como estambres, semillas inmaduras y tallos donde se encuentran concentraciones de 10-100 mg kg^{-1} de planta fresca. Este proceso no es factible económicamente debido a las concentraciones demasiado bajas de GAs en plantas (Kumar y Lonsane, 1989).

3. Cultivo microbiano

Este método es la forma tradicional y económicamente factible de obtener GAs para uso industrial, a partir de cepas seleccionadas de *G. fujikuroi* (Candau y col., 1991; Brückner y Blechschmidt, 1991b; Rybakov y Bourd, 1991; Uscanga-Reynell, 1992; Escamilla-Silva y col., 1999; Giordano y col., 1999; Raventos y col., 2000).

El cultivo microbiano se define como el proceso mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo, líquido o sólido, son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa como consecuencia de las actividades metabólicas. El microorganismo crece durante el transcurso del proceso, al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman nuevos productos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas (Ertola y col., 1995; Ramírez, 2004).

En general, para cualquier proceso de cultivo microbiano, podemos escribir la siguiente relación estequiométrica:

Fuente de C + Fuente de N + O_2 + Fosfatos + Minerales \rightarrow Biomasa + Productos + CO_2 + H_2O + Calor

La fuente comercial de las GAs bioactivas, particularmente GA_3 , es por cultivo sumergido del hongo *Gibberella fujikuroi*, microorganismo en el que las GAs fueron identificadas originalmente como productos secundarios (Phinney, 1983). Entre las características que indican que el GA_3 es un metabolito secundario se encuentran

que: 1) antes del agotamiento del nitrógeno se producen bajas concentraciones de GA₃, 2) la mayor producción de ácido giberélico se alcanza una vez la fuente de nitrógeno asimilable en el medio ha sido consumido totalmente y 3) su producción termina al agotarse la glucosa del medio de cultivo (Almanza-Rangel, 2005).

También la formación de GAs ha sido observada en otros hongos, tales como el *Sphaceloma manihoticola* (Rademacher y Graebe, 1979), *Neurospora crassa* (Kawanabe y col., 1983), *Phaeosphaeria* sp. (Sassa y col., 1994) y algunos otros patógenos de plantas (Rademacher, 1994). Es además, sintetizado en medio de cultivo por diversas bacterias tales como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* sp. (Karakoc y Aksöz, 2006). El hongo *G. fujikuroi* es único a causa de las cantidades relativamente altas de GAs que puede secretar (Linnemannstöns y col., 1999). De hecho, es el único microorganismo capaz de producir GAs en cantidades industriales (Oller-López y col., 2003).

a Cultivo sumergido

Al cultivo microbiano en medio líquido se le conoce como cultivo sumergido, y es el proceso más común para la obtención de GAs y actualmente países como Estados Unidos, Inglaterra, Japón, Hungría, Polonia y China producen GAs por este método. Es la técnica más usada para la producción de metabolitos secundarios, debido a que ofrece numerosas ventajas tales como fácil operación, se puede llevar a cabo en espacios reducidos, tiene gran confiabilidad y reproducibilidad en la inoculación y los patrones de crecimiento, mayor control aséptico para evitar contaminación y posibilidad de control de parámetros tales como pH, temperatura, condiciones nutricionales, entre otros (Robinson y col., 2001). Éste proceso puede llevarse a cabo tanto a nivel matraz, como en diferentes tipos de biorreactores.

La producción de GA₃ por el proceso de cultivo sumergido por lotes es principalmente controlado por regulación catabólica e involucra la inhibición de la represión del sustrato. Estos problemas se pueden superar mediante la adición de fuentes de carbono de lenta asimilación (Rodrigues y col., 2012) y por la alimentación lenta de fuentes de carbono fácilmente utilizables (Borrow y col., 1964) con el fin de lograr mayores rendimientos de GA₃. Para alcanzar una máxima producción de GAs, es importante considerar: 1) el microorganismo a utilizar, 2) la composición del medio

de cultivo y 3) las condiciones fisicoquímicas para el proceso (Brückner y col., 1991).

G. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO

Los estudios se iniciaron con el cultivo microbiano estacionario, después se estudió el cultivo sumergido en matraz agitado y finalmente en biorreactores. El GA₃ se produjo por primera vez por Yabuta y Sumiki (1938), los cuales usaron un medio simple constituido por glucosa o glicerol como fuente de carbono y cloruro de amonio como fuente de nitrógeno; en un sistema estático obtuvieron 10 µg mL⁻¹ de GAs después de 30 a 45 días de cultivo. En 1953, Kitamura obtuvo concentraciones de 37 µg mL⁻¹ de giberelinas bajo las mismas condiciones anteriores. La compañía inglesa "Imperial Chemical Industries" (ICI) obtuvo concentraciones de 200 µg mL⁻¹ en cultivos sumergidos en un medio de Raulin-Thom con 4 % de sacarosa (Brückner y Blechschmidt, 1991b).

La producción de GA₃ es influenciada por las condiciones de cultivo (fisicoquímicas, nutricionales e hidrodinámicas) presentes en el biorreactor (Kumar y Lonsane, 1989; Hollman y col., 1995; Patiño, 1995; Solorza-Salas, 1999; Escamilla-Silva y col., 2000; Negrete-Rodríguez, 2002; Monteiro-Machado y col., 2004; Almanza-Rangel, 2005; Shukla y col., 2005a; Chávez-Parga, 2005; Negrete-Rodríguez, 2007); algunos de los factores importantes incluyen pH, temperatura, aireación, la composición del medio de cultivo y el tiempo de incubación. Mención aparte merece la cepa del microorganismo utilizado, debido a que el éxito o fracaso de un cultivo microbiano comienza con la selección de la cepa (Ertola y col., 1995), la cual puede ser mejorada mediante mutación por diversos medios (por ej. luz UV) o utilizando herramientas de biología molecular. Para la producción de las giberelinas, especialmente GA₃ se han empleado diversos procesos.

Recientemente se han llevado a cabo los estudios para disminuir los costos de producción de GA₃ usando varios enfoques, tales como selección de hongos, la optimización de los nutrientes y condiciones de cultivo, el uso de residuos agroindustriales como sustrato, el desarrollo de nuevos procesos (inmovilización de células, cultivo por lote alimentado, biorreactor airlift) y la minimización de los costos del procedimiento de extracción (Rodrigues y col., 2012). Pierotty y col. (2006)

mencionan que se han utilizado diversas técnicas de cultivo a nivel laboratorio, tales como los trabajos iniciales de cultivo sumergido realizados por Borrow y col., (1964). Se tienen además investigaciones en células inmovilizadas por Jones y Pharis (1987), ensayos con sistemas de inmovilización basados en fibras poliméricas y diversos sistemas de fermentación en fase sólida realizados por Lu y col. (1995) y Gelmi y col. (2000; 2002).

Para producir GA₃ se han empleado distintos sustratos en el crecimiento del microorganismo y producción de la fitohormona. Gelmi y col. (2000) emplearon Amberlita IRA-900, una resina sintética a diferentes condiciones de temperatura y actividad del agua, utilizando urea como única fuente de nitrógeno. La cáscara de café y bagazo de yuca fueron empleados por Monteiro-Machado y col. (2004) en la fermentación a diferentes tiempos; estos residuos agroindustriales proporcionaron las diferentes fuentes de carbono. Durán-Páramo y col. (2004) y Nhujak y col. (2005) emplearon medios de cultivo sintéticos, indicando que las concentraciones bajas de nitrógeno favorecen la producción del GA₃. También se han empleado biocatalizadores soportados en matrices porosas para la producción de GA₃ en un medio nutritivo preparado a partir de sus componentes para el crecimiento del micelio y producción del ácido giberélico. Algunos investigadores utilizan residuos sólidos como sustrato para el crecimiento de *G. fujikuroi*. Tanto la cepa como el proceso han sido mejorados en los últimos años, obteniéndose concentraciones superiores de GAs (Escamilla-Silva y col., 2000).

H. RUTA BIOSINTÉTICA DE GIBERELINAS EN *Gibberella fujikuroi*

La ruta biosintética de GAs se elucidó principalmente por estudios de incorporación con moléculas marcadas en ¹⁴C de acetato y mevalonato, así como mediante el análisis de diferentes mutantes bloqueados con UV en un cierto paso de la ruta biosintética. Estas mutaciones dieron lugar a la acumulación de compuestos intermedios específicos, que podrían ser identificados por métodos cromatográficos como la espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases. El análisis de la vía de GAs de los hongos se completó cuando se identificaron los siete genes

biosintéticos (**Fig 4**) y fueron funcionalmente caracterizados (Tudzynski y col., 2003; Tudzynski, 2005; Bömke y Tudzynski, 2009).

La biosíntesis fúngica de GAs (**Fig 5**) comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA), lo cual resulta en la formación de hidroximetilglutaril coenzima A (Hmg-CoA) que es posteriormente reducido a mevalonato por la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HmgR) quien es la primer enzima específica para la síntesis de isoprenoides. Este paso se encontró que era limitante de la velocidad en la ruta de isoprenoides y que el mevalonato constituye el intermediario clave. Estudios previos revelaron mecanismos más complejos de regulación para HmgR a nivel transcripcional, postraducciona l y de proteínas, los cuales son altamente conservados entre hongos, plantas y mamíferos. El mevalonato se convierte posteriormente a través de isopentenil difosfato (IPP), dimetilalilo difosfato (DMADP), y geranil difosfato (GDP) a farnesil difosfato (FDP). El último paso es catalizado por la farnesil difosfato sintasa (FppS), que es, al igual que la HmgR, altamente conservada entre animales, plantas y hongos (Albermann y col., 2013).

F. fujikuroi tiene dos genes diferentes que codifican la GGDP sintasa, *ggs1* (Mende y col., 1997) y *ggs2*, siendo la última parte de la agrupación de genes de biosíntesis de GAs (Tudzynski y Hö lter, 1998). Mientras Ggs1 es responsable de la formación de ubiquinona y neurosporaxantina, Ggs2 constituye la primera enzima de la biosíntesis de GAs (Tudzynski y Hö lter, 1998). La supresión de *ggs2* dió lugar a la pérdida total de la producción de GAs, mientras que la supresión de *ggs1* demostró ser letal, indicando que las dos isoenzimas no pueden complementarse entre sí (Albermann y col., 2013).

El GGDP sintetizado por Ggs2 es convertido posteriormente a *ent*-kaureno a través de *ent*-copalildifosfato en una reacción de ciclación de dos pasos catalizada por la diterpeno ciclasa Cps/Ks. Los siguientes pasos secuenciales de oxidación a través del ácido *ent*-kaurenoico y GA₁₂, catalizado por las citocromo monooxigenasas P450-4 (*ent*-kaureno oxidasa) y P450-1 (GA₁₄ sintasa), conducen a la formación de GA₁₄ (Rojas y col., 2001; Tudzynski y col., 2001). La pérdida del carbono 20 por oxidación secuencial del C20 catalizada por la 20-oxidasa P450-2 resulta en la

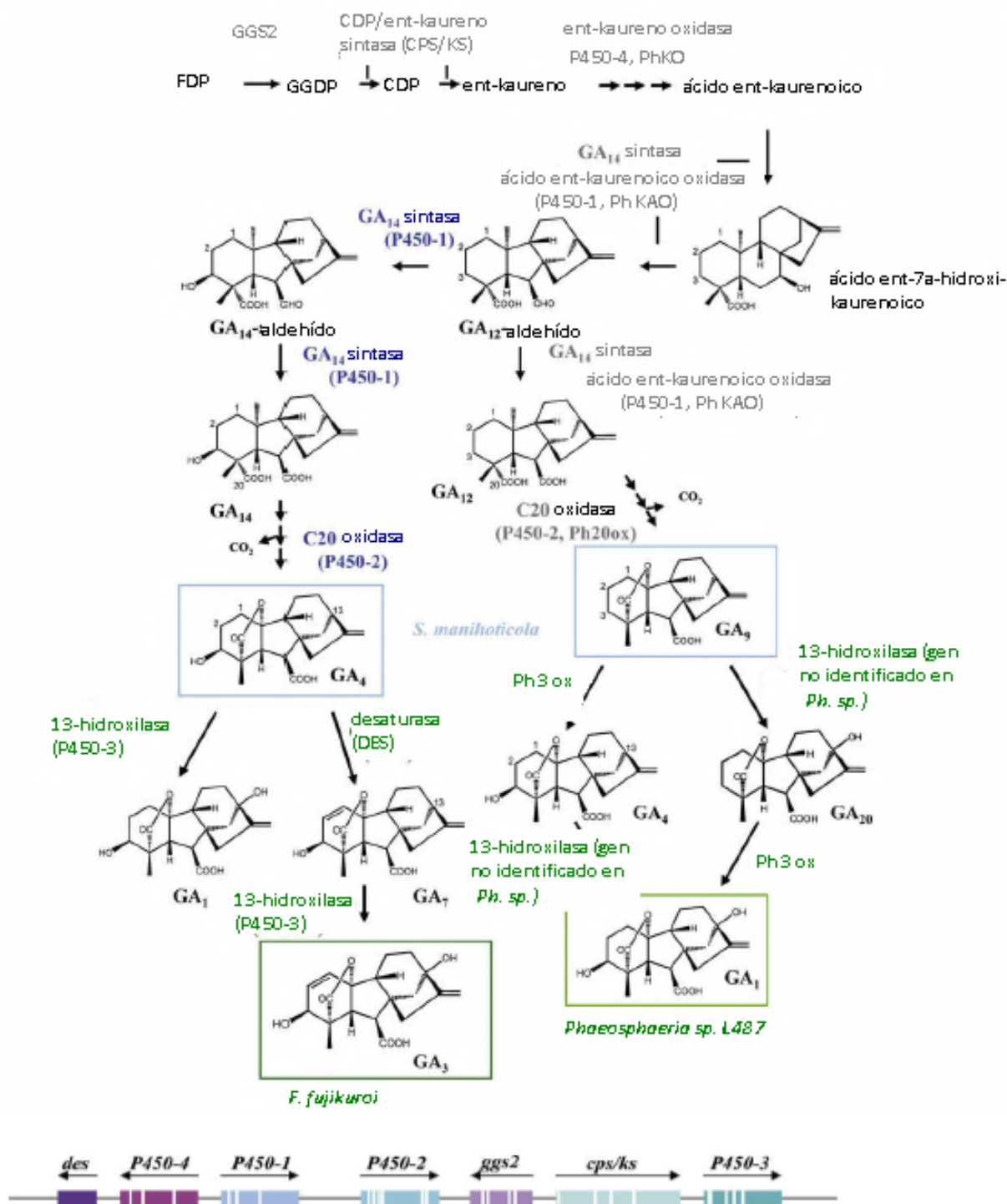


Fig 4. Ruta metabólica y *cluster* de genes de la biosíntesis de giberelinas en *Fusarium fujikuroi*.

Bömke y Tudzynski, 2009.

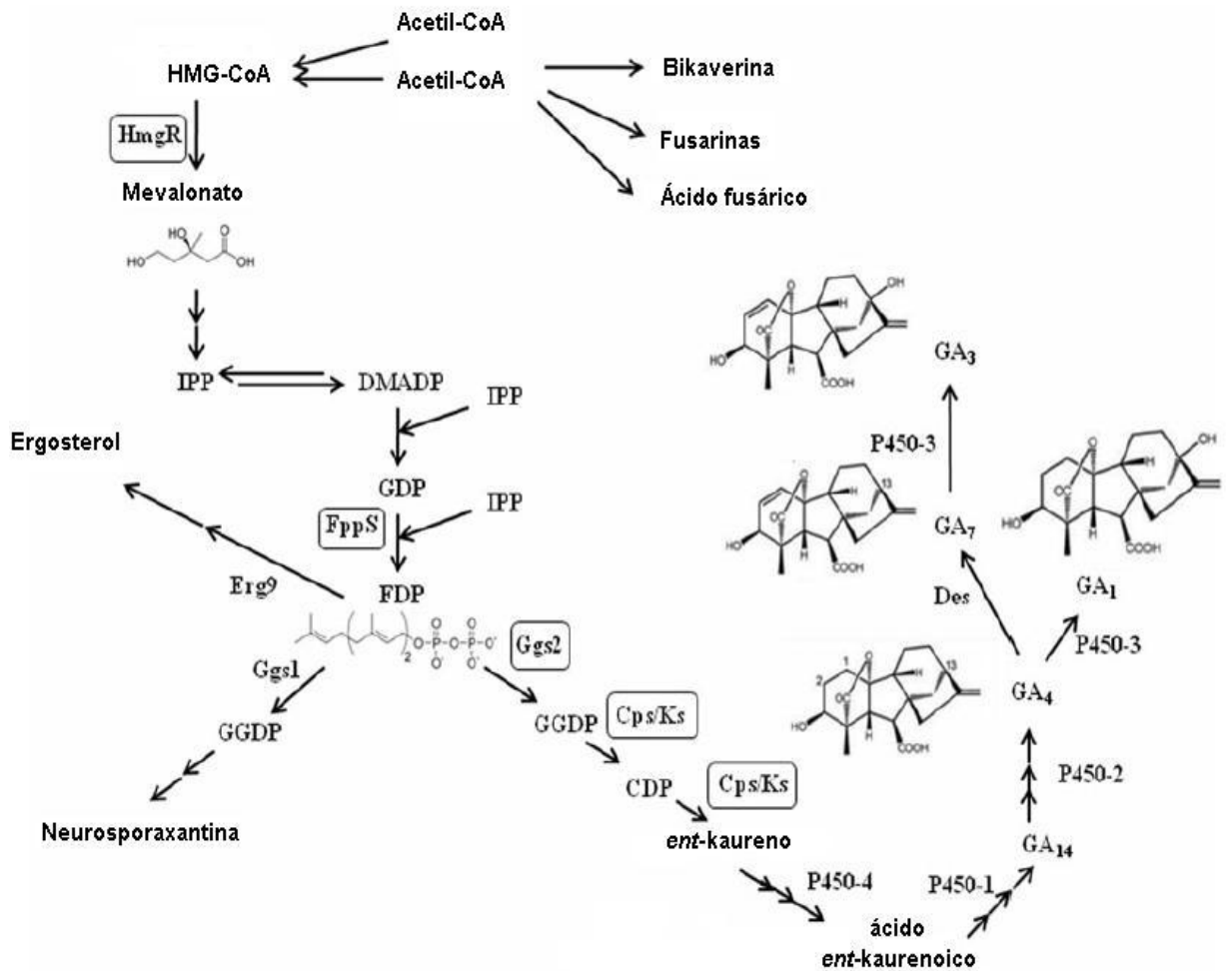


Fig 5. Ruta de isoprenoides y la biosíntesis de giberelinas en *Fusarium fujikuroi*. Albermann y col., 2013.

formación de la primera giberelina bioactiva, GA₄ (Tudzynski y col., 2002).

En un paso final, GA₇ se convierte en el producto principal, GA₃, por hidroxilación del C13, producto final de la vía en *G. fujikuroi*. Estas últimas reacciones se llevan a cabo por las enzimas desaturasas (Des) y la 13-hidroxilasa P450-3 (Tudzynski y col., 2003). La misma enzima P450-3 cataliza la hidroxilación del C13 de GA₄ para generar el producto GA₁ (Tudzynski y col., 2003; Bömke y Tudzynski, 2009) (**Fig 4**).

Todas estas giberelinas se presentan en diferentes cantidades, pero el principal producto de la biosíntesis a partir de *G. fujikuroi* es el GA₃.

Los primeros pasos de la vía biosintética de las GAs a partir de GGDP hasta la formación de aldehído-GA₁₂ (**Fig 4**) son idénticos en plantas superiores y en *G. fujikuroi*; por tanto se especulaba que la presencia de esta vía en el hongo era un ejemplo de transferencia horizontal de genes de la planta huésped al patógeno (Tudzynski y Hölter, 1998). Recientemente, con el descubrimiento de genes que codifican las enzimas biosintéticas de GAs en plantas y en *G. fujikuroi* y los otros dos hongos: *Phaeosphaeria* sp. y *Sphaceloma manihoticola* ha sido demostrado que la ruta de biosíntesis de GA en los hongos ha evolucionado independientemente, y difiere fundamentalmente de las plantas superiores a nivel químico, enzimático y genético (Bömke y Tudzynski, 2009).

I. ACETIL-CoA: NODO METABÓLICO COMÚN DE DISTINTOS METABOLITOS EN *Gibberella fujikuroi*

Un intento racional para canalizar los recursos de una célula en una ruta metabólica particular puede lograrse cuando la bioquímica de la ruta es conocida junto con un conocimiento de las otras vías competidoras que pueden servir para drenar precursores de distancia en otros productos menos deseables. Esto es particularmente importante para la producción de productos comerciales que pueden derivarse de un precursor común que se utiliza en la síntesis de otros componentes celulares. Tal es el caso de *F. moniliforme* etapa imperfecta de *G. fujikuroi* (Jacklin y col., 2000). Donde el precursor común es acetil-CoA en la ruta biosintética de *G. fujikuroi* para la síntesis de los diversos metabolitos secundarios (Giordano y Domenech, 1999; Albermann y col., 2013).

Jacklin y col. (2000) reportaron que el sesamol (3,4-metilenodioxifenol) un potente inhibidor de la biosíntesis de lípidos en concentración de 2.5 mM inhibió el crecimiento de *F. moniliforme* en aproximadamente un 40% y la acumulación de lípidos en un 35%, esto está en contraste con los resultados obtenidos para *Mucor circenelloides* donde la acumulación de lípidos celular fue fuertemente inhibida (en un 80%), mientras que el crecimiento celular no se vio afectada (Wynn y col., 1997). La acumulación de GA₃ se incrementó 20 veces, en presencia de sesamol lo que indica que la acetil-CoA destinada para la biosíntesis de ácido graso ahora estaba siendo conmutada a la acumulación del metabolito secundario (GA₃). La disminución de los lípidos provocada por sesamol después de 72 h fue de aproximadamente 2.5 g L⁻¹ mientras que el aumento de GA₃ ascendió aproximadamente 0.62 g L⁻¹ por lo tanto no era una completa desviación de la acetil-CoA, destinada a la producción de lípidos en giberelinas.

El hongo *G. fujikuroi* además de su capacidad para sintetizar GAs produce una mezcla compleja de sustancias estructuralmente relacionadas. El FDP puede ser empleado en la producción de metabolitos primarios, como ergosterol y la biosíntesis de ubiquinona, o funcionar como sustrato de la geranilgeranil difosfato sintasa (Ggs) que cataliza la síntesis de GGDP de FDP e IPP (**Fig 5**). Además puede producir una amplia gama de metabolitos secundarios, tales como los pigmentos neurosporaxantina y bikaverina y fusarubinas, micotoxinas tales como fusarinas o el ácido fusárico y carotenoides (Albermann y col., 2013).

En los experimentos de Jacklin y col. (2000) la síntesis de otros metabolitos a partir de acetil-CoA, tales como bikaverina y carotenoides, no se incrementaron en presencia de sesamol. Estos componentes, no obstante, raramente exceden 0.1 % de la biomasa celular y por lo tanto no constituyen una desviación importante de acetil-CoA lejos de otros metabolitos secundarios como lo son el GA₃ y lípidos. La desviación de acetil-CoA en giberelinas es por lo tanto factible simplemente al inhibir la biosíntesis de ácidos grasos. Por lo tanto la conmutación metabólica es factible mediante el uso juicioso de inhibidores que pueden así bloquear las rutas metabólicas primarias pero que no afectan la producción de metabolitos secundarios. Es posible volver a canalizar un precursor común de dos vías mediante el bloqueo de

su flujo en una sola vía que aumenta el rendimiento del producto de la vía secundaria.

Giordano y Domenech (1999) estudiaron el efecto de la aireación en la producción de GA₃ en cultivos en matraz por lotes con *G. fujikuroi* mediante la variación de la proporción aire y el medio de cultivo, sus resultados muestran que la aireación del cultivo juega un papel importante en la canalización de acetil-CoA en la biosíntesis de estos diferentes compuestos. La producción de bikaverina se incrementó en cultivos con aireación alta, mientras fusarina C fue el policétido predominante con aireación baja. De una manera similar, la producción de giberelinas se incrementó por la alta aireación, mientras que la acumulación de ácido graso se redujo. Además experimentos de alimentación con sustratos marcados revelaron diferencias entre la biosíntesis de los ácidos grasos y la bikaverina. El acetato fue más eficaz que la leucina en la producción de ácido palmítico. La leucina, sin embargo, un compuesto capaz de producir acetil-CoA y el ácido acetoacético, resultó ser una mejor fuente para la biosíntesis de bikaverina que para los ácidos grasos. La capacidad de *G. fujikuroi* para utilizar estas fuentes de carbono exógenos para sintetizar ácidos grasos y bikaverina indica que la biosíntesis de estos compuestos emplea diferentes depósitos de acetato como precursores. Resultados similares mostraron que tres diferentes terpenoides (giberelinas, carotenoides y esteroides), se sintetizan en diferentes compartimentos celulares. Este también parece ser el caso en las células vegetales, donde diferentes depósitos de acetil-CoA son generados en plástidos, cloroplastos y mitocondrias. Aunque la síntesis de giberelinas y bikaverina responde a varias combinaciones de señales, tales como la disponibilidad de nitrógeno, nitrato y el pH del medio, ninguna vía metabólica está sujeta a regulación común. En conclusión los resultados indican que el oxígeno, *per se* o a través de un metabolito, afecta a la utilización del acetato en *G. fujikuroi*. Esta regulación puede implicar efectos reguladores específicos sobre las enzimas clave de las diferentes vías metabólicas, o, alternativamente, puede controlar el acceso del acetato para los compartimentos diferentes en donde suceden estos procesos biosintéticos.

J. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE GIBERELINAS

Durante el proceso de cultivo microbiano para la producción de GA₃, diferentes giberelinas también se pueden sintetizar. La cuantificación de GAs siempre ha sido extremadamente difícil, ya que las GAs presente poca absorción ultravioleta (UV), fluorescencia, y no hay características químicas distintivas que pueden formar la base de un ensayo de química específica (Croker y Hedden, 2000; Taiz y Zeiger, 2006).

Los métodos para la cuantificación de GA₃ se basaron inicialmente en la medición de los cambios de crecimiento promovido por GA₃ de diferentes órganos de la planta y todas sus partes. Los bioensayos se utilizan actualmente cuando se requieren altos niveles de especificidad y sensibilidad, pero que no son adecuados para el seguimiento de GA₃ durante el cultivo microbiano donde se requieren resultados rápidos. Para este propósito son preferidos los métodos más simples y rápidos, como los colorimétricos, espectrofotométricos y fluorimétricos (Berríos y col., 2004). El método espectrofotométrico propuesto por Holbrook y col. (1961), es uno de los métodos más simples y más ampliamente utilizados para determinar la cantidad de GA₃ en los estudios de cultivo microbiano. Estos métodos tienen la desventaja de que la muestra debe ser pre-tratada para eliminar las sustancias interferentes presentes en el caldo de cultivo.

En comparación con los métodos de detección convencionales, la espectrometría de masas (MS) es particularmente valioso en el análisis de GAs. Además, MS representa una mayor sensibilidad y especificidad universal que cualquiera de los otros detectores disponibles y tiene la ventaja de identificación analito positivo. Con la creciente disponibilidad de cromatografía de gases (GC) combinada con espectrometría de masas (GC-MS), este método analítico altamente sensible y selectivo es la mejor opción para el análisis cuantitativo de las GAs endógenas. Aunque el enfoque de GC-MS proporciona un rendimiento impresionante, procedimientos de derivatización son siempre indispensables para la separación por GC (Rodrigues y col., 2012).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un enfoque potencialmente atractiva para estas fitohormonas polares y térmicamente lábiles. Los detectores

utilizados son UV o detección de matriz de fotodiodos (PDA) para la separación de fitohormonas en muestras de plantas. El reciente desarrollo de la cromatografía líquida (LC) combinada con MS (LC-MS) permite el análisis directo de compuestos de GAs en el eluyente de LC sin la modificación química requerida para el análisis de GC (Rodrigues y col., 2012).

Más recientemente, la electroforesis capilar (CE) combinada con espectrometría de masas (CE-MS) ha surgido como una poderosa herramienta para la caracterización de especies cargadas y esta tecnología se ha utilizado con éxito en el análisis de fitohormonas, así como algunos otros compuestos naturales, tales como aminoácidos, oligonucleótidos y proteínas. La CE es considerada una excelente alternativa a HPLC, ya que ofrece una mayor eficiencia de la separación y el menor consumo de muestra y reactivos (Rodrigues y col., 2012).

K. CULTIVO A NIVEL MATRAZ

Los matraces de agitación son ampliamente utilizados en las investigaciones sobre el cultivo de microorganismos y los productos que sintetizan. Los cultivos a nivel matraz son muy convenientes por su bajo costo y fácil operación, poseen un diseño simple y funcional que permite realizar un gran número de experimentos de manera simultánea y a un costo accesible y eficiente (Peter y col., 2005; Li y col., 2013; Ramos-Miranda, 2014). Un matraz de agitación es un biorreactor muy conveniente por lo que son ampliamente utilizados en el desarrollo y optimización de procesos en el área de la Biotecnología (Bünchs, 2001), tales como cultivo celular, optimización de medios y detección de cepas microbianas, además son muy utilizados en la industria para modificar condiciones de operación o probar diferentes sustratos en el medio de cultivo (Ramos-Miranda, 2014).

1. Matraz con deflectores

En el caso de cultivos microbianos que involucran hongos, su naturaleza filamentosa comúnmente conduce a una excesiva viscosidad en el cultivo y una demanda mayor de agitación y aireación para mantener los niveles de oxígeno disuelto. El oxígeno disuelto en el medio de cultivo es muy poco soluble y el consumo de oxígeno para el crecimiento microbiano es alto. La transferencia de oxígeno del

gas hacia los microorganismos se lleva a cabo en varias etapas. Primero, el oxígeno debe viajar a través del gas hacia la interfase gas-líquido, después a través de la interfase, a través del líquido y, finalmente, hacia el microorganismo. El proceso completo es impulsado por la diferencia entre la concentración de oxígeno en el gas y en el microorganismo.

Una de las medidas más simple y eficaz para lograr altas transferencias de oxígeno en matraces agitados, es la introducción de deflectores lo que provoca una mayor agitación del fluido y la generación de una gran cantidad de pequeñas burbujas. Ramos-Miranda (2014), caracterizó por medio de técnicas de visualización la incorporación de aire y la dispersión de biomasa para tres diferentes configuraciones de matraces, encontrando que los matraces lisos no incorporan aire durante la agitación, mientras que los matraces con resortes incorporan aire y lo retienen, y los matraces con deflectores (**Fig 10**) incorporan aire de manera continua y producen corrientes internas capaces de romper las burbujas de aire. Así mismo, se encontró que la dispersión de la biomasa está estrechamente relacionada con la configuración de los matraces. De los resultados obtenidos en dispersión de biomasa, puede observarse que la geometría juega un papel determinante, para el matraz liso el micelio filamentoso se aglomera, para el matraz con deflectores se observan trozos medianos y deformes, para el matraz con resorte, se observa que prácticamente la biomasa se dispersa en el medio.

El uso de matraces con deflectores muestran ventajas potenciales en comparación con los matraces convencionales debido a que incrementan la superficie de intercambio gaseoso (Galindo y col., 2004), siendo ideales para los cultivos microbianos aeróbicos y de hongos filamentosos como lo es el cultivo con *G. fujikuroi*. La biosíntesis de GAs involucra muchos pasos oxidativos, una apropiada aireación durante el cultivo microbiano es crítica para una producción óptima ya que en los microorganismos aerobios estrictos, la obtención de energía está ligada a la presencia de O₂. La aireación y mezclado ayudan además a remover el dióxido de carbono y otros metabolitos gaseosos que inhiben la producción de las GAs.

En cultivo de *Botryosphaeria sp.* se estudió el efecto de la aireación en el crecimiento y en la producción de lacasas (PPO-I y PPO-II) en matraces con

deflectores en presencia y ausencia de alcohol veratrílico, los resultados fueron comparados con los cultivos crecidos en matraces que no tenían deflectores. Los niveles de PPO-I y PPO-II en los matraces con deflectores aumentaron 4-5 veces más que los cultivos crecidos en matraces convencionales, y alcanzaron un máximo dentro de 4-5 días de crecimiento. Además se observó que el alcohol veratrílico se consume más rápidamente cuando se cultivan bajo condiciones de mayor aireación, y había desaparecido completamente dentro de 216 h de crecimiento, mientras que en matraces convencionales, hubo un lento, pero constante, consumo de alcohol veratrílico por el hongo durante su crecimiento (Dekker y Barbosa, 2001).

L. FACTORES NUTRICIONALES

El medio de cultivo es una mezcla compleja de sustancias capaces de satisfacer las exigencias nutricionales particulares de microorganismos específicos. No todos los nutrientes se requieren en las mismas cantidades; algunos llamados macronutrientes, se precisan en grandes cantidades; mientras que otros, llamados micronutrientes, se requieren en menores cantidades, y a veces solo en trazas (Madigan y col., 2008).

Es importante contar con un medio de cultivo adecuado ya que es una mezcla que contiene las concentraciones y cantidades necesarias de los nutrientes requeridos para un buen crecimiento del microorganismo y desde luego para la producción del metabolito deseado. Todos los nutrientes se encuentran en exceso al principio del cultivo y el criterio que se tome para la composición del medio y las condiciones de cultivo repercutirá en la velocidad de producción de GA_3 y sus concentraciones residuales. La producción económicamente rentable de metabolitos secundarios requiere, que una proporción máxima de los nutrientes disponibles estén dirigidos a la formación del producto y un mínimo a la formación de biomasa. Los hongos son organismos heterotróficos y por lo tanto requiere una variedad de nutrientes orgánicos para llevar a cabo todas las funciones bioquímicas. Sin embargo, los carbohidratos siguen siendo su mejor fuente de energía (Aparecida-Takahashi y col., 2013).

1. Fuente de carbono

La fuente de carbono es uno de los factores nutricionales más importantes en producción de metabolitos, y tiene gran influencia sobre el crecimiento celular, el consumo de sustratos y formación de subproductos (Liu y col., 2011).

La glucosa es la fuente de carbono más usada en la biosíntesis de GAs, pero existen reportes que al inicio del cultivo microbiano concentraciones por encima del 20 % se deben evitar, debido a que causa represión catabólica (Monteiro-Machado y Soccol, 2007; Rodrigues y col., 2012). Algunas alternativas para evitar la represión catabólica es el uso de fuentes complejas; entre las que están los almidones, el licor de maíz, la maltosa, galactosa, harinas y aceites vegetales o el uso mezclas de fuentes de carbono de rápida y lenta asimilación.

El empleo de las fuentes complejas de origen vegetal, como las harinas, aceites vegetales (Gancheva y col., 1984; Muromtsev y Agnistova, 1984) y el licor de maíz, han reportado incrementos en la producción con respecto a fuentes inorgánicas. Algunos informes sugieren que los extractos de harina y aceite de plantas podrían contener precursores o inductores de la vía GAs (Vass y Jefferys, 1979; Rademacher, 1994). El aumento en el rendimiento de GAs se atribuye a que los aceites vegetales favorecen la disponibilidad de acetil-CoA para su producción (Kumar y Lonsane, 1989; Tudzynski, 1999), además, esta reportado que podrían contribuir al incremento de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (Tudzynski, 1999; Shukla y col., 2003). En el empleo de harinas, también se atribuye a que proporcionan compuestos nitrogenados, los cuales pueden afectar la capacidad amortiguadora del medio de cultivo. La producción de GA₃ en cultivo sumergido generalmente emplea una única fuente de carbono, y fuentes de carbono mixtas se han propuesto como alternativa útil.

a Fuentes de carbono mixtas

El cultivo microbiano con fuente de carbono mixta es una estrategia eficaz para mejorar la producción de productos metabólicos. Varias explicaciones se han hecho con respecto al mecanismo de fuentes de carbono mixtas para la mejora de los productos microbianos: (1) Suministran diferentes fuentes de carbono para la

formación de biomasa y la síntesis del producto, (2) Proporcionan una fuente de carbono específica para la síntesis de precursores metabólicos (Chen y col., 2011).

Entre las investigaciones reportadas utilizando fuentes mixtas de carbono para la producción de GAs destacan la utilización de glucosa y harina de arroz (Escamilla-Silva y col., 2000; Shukla y col., 2005a); y la utilización de la fuente mixta glucosa-glicina (Hollmann y col., 1995). Recientemente, Rios-Irube y col. (2011), reportaron que el uso de fuente de carbono mixta glucosa-aceite de maíz ejerce un efecto inductivo sobre la producción de GA₃ con respecto a utilizar glucosa como única fuente de carbono.

En la producción de otros metabolitos se han realizado diversos estudios utilizando fuentes de carbono mixtas. Jong-Sun y Hwa-Won (2001) realizaron fermentaciones ácido lácticas con *Enterococcus faecalis* RKY1 utilizando mezclas de fuente de carbono glucosa-fructosa, glucosa-maltosa y fructosa-maltosa. En el cultivo con glucosa-fructosa ambos azúcares fueron metabolizados simultáneamente y el crecimiento celular y la productividad volumétrica media fueron mayores que en los cultivos donde se utilizó los azúcares individuales como única fuente de carbono. En los cultivos glucosa-maltosa y fructosa-maltosa se metabolizaron preferentemente la glucosa y la fructosa; Bianchi y col. (2001) reportaron el efecto de una segunda fuente de carbono para la producción de L-lisina por células de *Corynebacterium glutamicum* cepa ATCC 21543. Las células fueron cultivadas en glucosa, ácido glucónico y su mezcla, observando en el cultivo con ambas fuentes de carbono la concentración de L-lisina fue 1.8 veces más alta que en el que solo se utilizó ácido glucónico. Peacock y col. en el 2003 probaron glucosa, trioleína de triacilglicerol y su combinación en el cultivo con *Streptomyces lividans* y reportaron que la bacteria creció a una densidad celular más alta y produjo actinorrodina (antibiótico) más rápido utilizando la fuente mixta que con solo un sustrato. Existen otras investigaciones utilizando células recombinantes de *C. glutamicum* donde probaron mezclas con glucosa-fructosa (Georgi y col., 2005) y glucosa-arabinosa (Schneider y col., 2011) para la producción de aminoácidos L-lisina, L-glutamato además de L-ornitina y L-arginina. En 2012, Chen y col. reportaron el uso de glucosa-glicerol como una eficiente estrategia de co-fermentación para incrementar la producción de ϵ -poli-

L-lisina por *Streptomyces* sp. M-Z18 y que el simultáneo consumo de glucosa y glicerol reduce sustancialmente el tiempo de consumo de los sustratos. Recientemente, Wang y Yang (2013) estudiaron la producción de ácido propiónico en una co-fermentación glucosa-glicerol por *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii* obteniendo un alto rendimiento y productividad así como alta selectividad del producto; Xiea y col. (2013), publicaron el mejoramiento sobre la expresión de angiostatina (inhibidor endógeno de la angiogénesis) al utilizar mezclas de fuentes de carbono metanol-glicerol, metanol-sorbitol y metanol-lactato en comparación con el cultivo con metanol como única fuente de carbono al utilizar la cepa recombinante *Pichia pastoris*. Ramos-Lozano (2015) investigó el efecto de la mezcla glucosa-glicerol bajo condiciones limitadas de nitrógeno en cultivos de *G. fujikuroi* y observó un incremento en la producción de GA₃ de 1.7 veces más con respecto a utilizar glucosa como única fuente de carbono.

2. Fuente de nitrógeno

Después del carbono, el siguiente elemento más abundante en las células es el nitrógeno. La fuente de nitrógeno puede ser de naturaleza orgánica o inorgánica así como mezclas complejas en la generación de crecimiento y producción de metabolitos secundarios (Aparecida-Takahashi y col., 2013), es utilizado para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. La calidad y cantidad de nitrógeno en los medios de cultivo son muy importantes para la producción de giberelinas debido al proceso de regulación por amonio en hongos, el mecanismo molecular de la dependencia de nitrógeno no se ha comprendido totalmente (Tudzynski, 2014). Existen reportes de que el nitrógeno inorgánico inhibe la actividad de la enzima GA₄ 1,2-deshidrogenasa involucrada en la biosíntesis de GAs, llevando a la acumulación de GA₄ y GA₁, por lo que se ha sugerido que no debe existir nitrógeno en la etapa de producción de GA₃ (Brückner y Blechschmidt, 1991b; Giordano y Domenech, 1999). Los altos rendimientos de GA₃ se alcanzan cuando la concentración de nitrógeno en los medios de cultivo es baja, de hecho, la producción comienza cuando se agota el nitrógeno.

Brückner y Blechschmidt (1991b) realizaron experimentos en matraz en medios con altas (38 mM ó 5.02 g L⁻¹) y bajas (19mM ó 2.51 g L⁻¹) concentraciones de

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se estudió mediante la adición de cicloheximida a los cultivos por lotes de varias edades. La producción óptima se produjo a 19 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y la síntesis de GA_3 se redujo tres veces en un medio con 38 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Escamilla-Silva y col. (1999) realizaron cultivos por lotes con *G. fujikuroi* en biorreactor con concentraciones de 1 y 3 g L⁻¹ de NH_4Cl y reportan que la mayor producción de GA_3 (1100 mgL⁻¹) fue cuando se utilizó la concentración de nitrógeno más baja, el medio de cultivo fue diseñado para satisfacer los requerimientos nutricionales de *G. fujikuroi* y la relación C:N era tal que el nitrógeno fue limitante favoreciendo la producción de GA_3 . Martínez-Torres (2014) realizó cultivos microbianos con fuente mixta glucosa-aceite de maíz en matraces con deflectores y tapa de ventilación con tres diferentes concentraciones de NH_4Cl (1, 1.5 y 2 g L⁻¹) encontrando que bajo las condiciones probadas la concentración con la que más GA_3 se produjo fue con 1.5 g L⁻¹ (1138 mg L⁻¹).

Los hongos filamentosos como *G. fujikuroi* son capaces de utilizar muchos compuestos como únicas fuentes de nitrógeno, pero utilizan preferentemente fuentes de nitrógeno energéticamente favorecidas tales como NH_4^+ y glutamina durante el tiempo que están presentes en el medio. En ausencia de estas fuentes, fuentes de nitrógeno menos fácilmente asimilables tales como nitrato, urea, ácido úrico, aminas, amidas, purinas y pirimidinas también se pueden utilizar (Tudzynski, 2014). También se han usado fuentes de nitrógeno complejas que son consumidas más lentamente como glicina, tartrato de amonio, el licor de maíz y las harinas vegetales (cacahuate, arroz, maíz, algodón y soya) (Rodrigues y col., 2012). La selección de la fuente de nitrógeno, su concentración y su relación inicial con la fuente de carbono son determinantes en la biosíntesis de GAs y productividad de GA_3 (Monteiro-Machado y Soccol, 2007) ya que la formación de GAs es la de un metabolito secundario típico que requiere crecimiento desequilibrado y la producción del metabolito extendida se produce en presencia de un sustrato de carbono suficientemente disponible (Borrow y col., 1964; Brückner y Blechschmidt, 1991a; Tudzynski, 1999). La influencia de la relación de C:N está directamente relacionada con la producción de GA_3 . La cantidad de C y N debe permitir el crecimiento de micelio activo inicial en un medio limitado en

nitrógeno. Cambios en la relación C:N en el medio podría ser utilizado para producir selectivamente bikaverina o ácido giberélico (Escamilla-Silva y col., 1999).

a Regulación de nitrógeno de metabolitos secundarios fúngicos

Tudzynski (2014) propuso un mecanismo de regulación que permite la utilización preferencial de fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables en una circunstancia, pero la utilización selectiva de fuentes de nitrógeno secundarias, en otra circunstancia se conoce como represión de metabolitos por nitrógeno. Este circuito regulador global asegura la activación transcripcional de genes estructurales que codifican enzimas y permeasas requeridos para la búsqueda y la degradación de fuentes de nitrógeno energéticamente menos favorecida. En ascomicetos, la represión de metabolitos por nitrógeno está mediada por factores de transcripción que pertenecen a la familia GATA (familia de proteínas caracterizadas por su capacidad de unirse a la secuencia de ADN "GATA" donde G=Guanina, A=Adenina y T=Timina).

Los hongos son capaces de responder a los cambios cuantitativos y cualitativos en la disponibilidad de nitrógeno a través de los mecanismos de regulación complejas. Los componentes de esta red de regulación son sensores de nitrógeno, cascadas de señalización, por ejemplo, la cascada de TOR, factores de transcripción y otras proteínas reguladoras que podrían ser capaces de interactuar. Los hongos filamentosos tienen dos factores de transcripción GATA implicados en la regulación por nitrógeno, AreA y AreB. Los anteriores factores actúan como regulador positivo activando la expresión de un conjunto de genes regulados por nitrógeno cuando las fuentes de nitrógeno preferidas, tales como glutamina o amoníaco, son limitadas. En los últimos años se han logrado avances significativos en la comprensión de cómo funciona AreA. Además de su unión a los promotores de los genes diana, AreA tiene un importante papel en la capacidad de mediar la remodelación de la cromatina mediante el aumento de la acetilación de la histona H3. En lo que respecta a AreB poco se sabe sobre su funcionamiento. Trabajos recientes en *F. fujikuroi* evidencian que AreB puede actuar tanto como regulador positivo y negativo, y regula genes diana comunes con AreA, pero también los genes diana específicos AreB.

En conjunto con los genes implicados en la utilización y la metabolización de diferentes fuentes de nitrógeno, AreA es bien aceptado como regulador de metabolitos secundarios. Tras el hallazgo de que AreA es esencial para la expresión de los genes biosintéticos de GAs en *F. fujikuroi*, también mostraron dependencia del AreA. Recientemente se ha demostrado que tanto el AreA y AreB son esenciales para la expresión génica de GAs, mientras que sólo afecta positivamente AreB la biosíntesis de apicidina F y de ácido fusárico.

Junto a los dos principales factores de transcripción AreA y AreB, algunos otros reguladores han demostrado afectar la producción de metabolitos secundarios, como MeaB, Tor, y la glutamina sintasa (GS). También una de las tres permeasas de amonio, MeaB, parece jugar un papel como sensor además de su función de transporte (**Cuadro 5**). Un modelo de la función de los componentes individuales de la red de regulación de nitrógeno en *F. fujikuroi* con énfasis en el metabolismo secundario se muestra en la **Fig 6**.

3. Otros macronutrientes

Los requerimientos de fósforo (P), azufre (S), potasio (K) y magnesio (Mg) son suministrados en forma de sales. El P se presenta en la célula en forma de fosfatos orgánicos e inorgánicos, y las células lo necesitan para la síntesis de ATP, ácidos nucleicos y fosfolípidos. El S se requiere porque es un componente estructural de los aminoácidos cisteína y metionina y porque se presenta en ciertas vitaminas como la tiamina, la biotina, y el ácido lipoico, así como la coenzima A (Madigan y col., 2008). Una parte importante de K está unida al RNA, de manera que los requerimientos de K aumentan con los factores que influyen en el aumento del RNA en las células, como la velocidad de crecimiento. El ión K actúa como coenzima y probablemente actúa como catión en la estructura aniónica de varios componentes celulares. El ión Mg es esencial para la estabilidad de los ribosomas, las membranas celulares y actúa como cofactor en numerosas reacciones del metabolismo (Ertola y col., 1995).

4. Micronutrientes

Aunque se requieren en muy pequeñas cantidades son tan importantes para el funcionamiento celular como las macronutrientes. Estos elementos trazas están representados por las sales de hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), calcio

Cuadro 5. Funciones de los reguladores involucrados en el control del metabolismo secundario dependiente de nitrógeno

Regulador	Función
AreA	Factor de transcripción GATA: regulador positivo de la expresión de genes GA, fumonisinas, DON, zearalenona, fusarielina H, beauvericina y cefalosporina. AreA está involucrado en la accesibilidad de la cromatina y es esencial para la virulencia total de algunos patógenos de plantas.
AreB	Factor de transcripción GATA: regulador positivo de la biosíntesis de GA, ácido fusárico y apicidina F. areB interactúa con AreA bajo condiciones de limitación de nitrógeno.
Nmr	Regulador negativo de la actividad de AreA, la supresión de nmr1 resultó en el incremento de la sensibilidad a clorato. Sin embargo, la supresión de nmr1 no anula la represión de los genes GA, DON, zearalenona y fusarielina H bajo altas condiciones de nitrógeno en <i>Fusarium</i> spp.
Tor	La inhibición de Tor por rapamicina llevó a la sobre-regulación de los genes biosintéticos de GA y bikaverina bajo condiciones de limitación de nitrógeno, pero no anula su represión a alto nitrógeno.
MepB	Fuerte de la represión de los genes biosintéticos de GA y bikaverina en el mutante de supresión mepB bajo condiciones de suficiente nitrógeno; se sugirió detección o papel regulador de MepB.
GS	La supresión de gln1 resultó en la pérdida de la expresión de genes GA, bikaverina, fusarina y apicidina F y sobre regulación de los genes areA, areB, mepB, y nmr1; afecta el metabolismo energético.
MeaB	Factor de transcripción bZIP; afecta la expresión de diversos genes regulados por nitrógeno; elevó la expresión de genes biosintéticos de GA y bikaverina en la supresión de la mutante bajo condiciones de limitación de nitrógeno; la sobre-expresión de meaB de <i>A. nidulans</i> da lugar al deterioro en planta de la producción de aflatoxina B1.
Vel1/VeA	FfVel1 puede parcialmente superar la represión de nitrógeno de genes bikaverina, los mutantes en VeA de <i>F. oxysporum</i> están dañados en crecimiento sobre nitrato.

Tudzynski, 2014

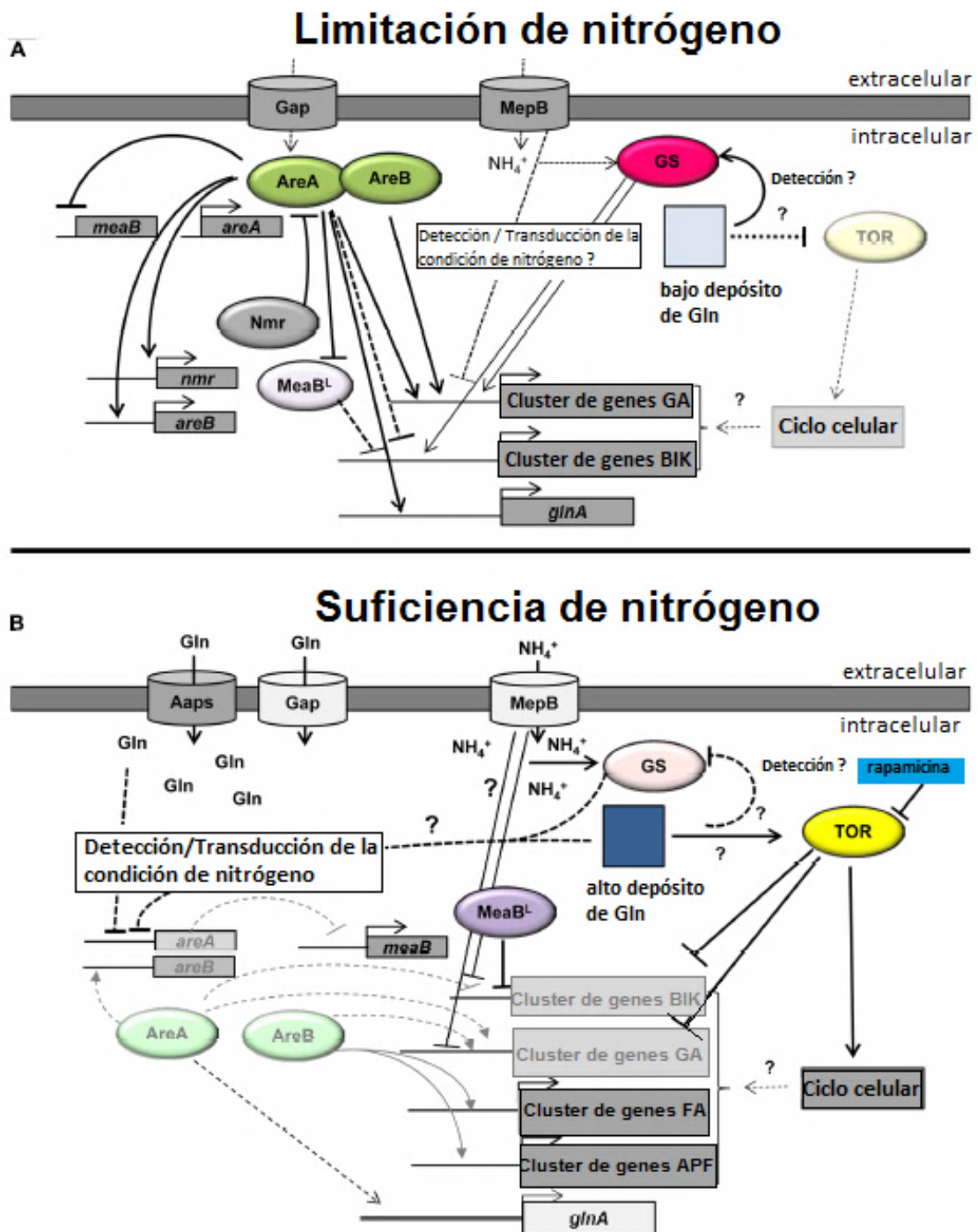


Fig 6. Modelo de regulación del metabolismo secundario en *Fusarium fujikuroi*. Tudzynski, 2014.

(Ca), zinc (Zn), cobalto (Co) y cobre (Cu), que se agregan a los medios en cantidades de mg o $\mu\text{g L}^{-1}$, y son frecuentemente esenciales para el crecimiento (Ertola y col., 1995) y en la síntesis de algunos metabolitos. Muy poca información está disponible sobre el efecto de los elementos traza en la producción microbiana de GA_3 (Rodrigues y col., 2012). A veces es difícil demostrar un requerimiento de un micronutriente porque generalmente está presente en suficiente cantidad como impureza de los componentes principales. No obstante si el medio de cultivo contiene compuestos muy puros, disueltos en agua destilada de alta pureza, se añaden al medio en una solución de elementos traza.

M. CONDICIONES DE CULTIVO

La producción exitosa en un metabolito fúngico requiere de un conocimiento detallado de las características de crecimiento y de la fisiología del microorganismo en cuestión. Cada hongo tiene su propio desarrollo anatómico, morfológico y fisiológico. Para una máxima formación del producto de cada cultivo microbiano se deben establecer las condiciones de incubación precisas y el estado adecuado de desarrollo.

Para la producción de GA_3 el intervalo de pH de 3.5 a 6.5 es generalmente usado (Brückner y Blechschmidt, 1991a), con pH superior a 5.5 se producen otras giberelinas como GA_4/GA_7 (Negrete-Rodríguez, 2007).

El efecto de la temperatura sobre la producción de GA_3 , es dependiente de la cepa empleada (Monteiro-Machado y Soccol, 2007). Diferentes condiciones de temperatura han sido estudiadas en el rango de 25-30 °C. La temperatura óptima para la producción de GA_3 con *G. fujikuroi* cepa H-984 se ha reportado de 29 °C (Escamilla-Silva y col., 2000).

El suministro de aire es muy importante para la producción de GAs con altos rendimientos, ya que es un bioproceso estrictamente aeróbico (Brückner y Blechschmidt, 1991a). Debido a que la biosíntesis de giberelinas implica muchos pasos oxidativos, que son catalizadas por monooxigenasas citocromo P-450, dioxigenasas y deshidrogenasas, una condición de alta aireación es fundamental para un proceso de producción óptimo (Rodrigues y col., 2012). La demanda de

oxígeno aumenta durante la fase exponencial de crecimiento del micelio (Tudzynski, 1999) y esta se debe satisfacer a través de la aireación y mezclado (Kumar y Lonsane, 1989).

N. CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO

En la **Fig 7** se representa la curva característica de crecimiento de un microorganismo (Lee, 1992; Ertola y col., 1995) cultivado por lotes, donde se pueden apreciar distintas fases durante el crecimiento.

La fase lag (o de latencia) (I) es el periodo inicial del cultivo durante cual hay muy baja concentración de células viables. Aunque el número de células no incrementa, estas pueden crecer en tamaño durante este periodo. La longitud de este periodo lag depende de varios factores como el tipo y edad de microorganismos, de la cantidad de inóculo y de las condiciones de cultivo. En esta fase las células se deben ajustar al nuevo medio antes de comenzar a crecer. Si los microorganismos son inoculados desde un medio con baja concentración de nutrientes, la longitud del periodo lag es usualmente larga. Esto es debido a que las células deben de producir las enzimas necesarias para la metabolización de los nutrientes disponibles. Si las células son transferidas desde un alta a baja concentración de nutrientes, usualmente no hay fase lag. Otro factor importante que afecta la longitud de la fase lag es la cantidad de inóculo. Si un número bajo de células son inoculadas en un gran volumen habrá una larga fase lag. Para la operación de escalamiento del cultivo celular, uno de los objetivos hacer esta fase lag lo más corta como sea posible. Por lo tanto, para inocular un biorreactor a escala industrial, se requiere tener una serie de inóculos progresivamente mayor para minimizar el efecto de la fase de latencia.

Al final de la fase lag, cuando el crecimiento comienza, la tasa de división incrementa gradualmente y alcanza un valor máximo en el periodo de crecimiento exponencial, como se muestra por la inflexión ascendente (II) en la **Fig 7**. Este periodo transicional es comúnmente conocido como fase de crecimiento acelerado y es frecuentemente incluida como parte de la fase lag. La fase de aceleración (II) es aquella en la cual el número de células comienza a incrementarse y la tasa de división aumenta hasta alcanzar un máximo.

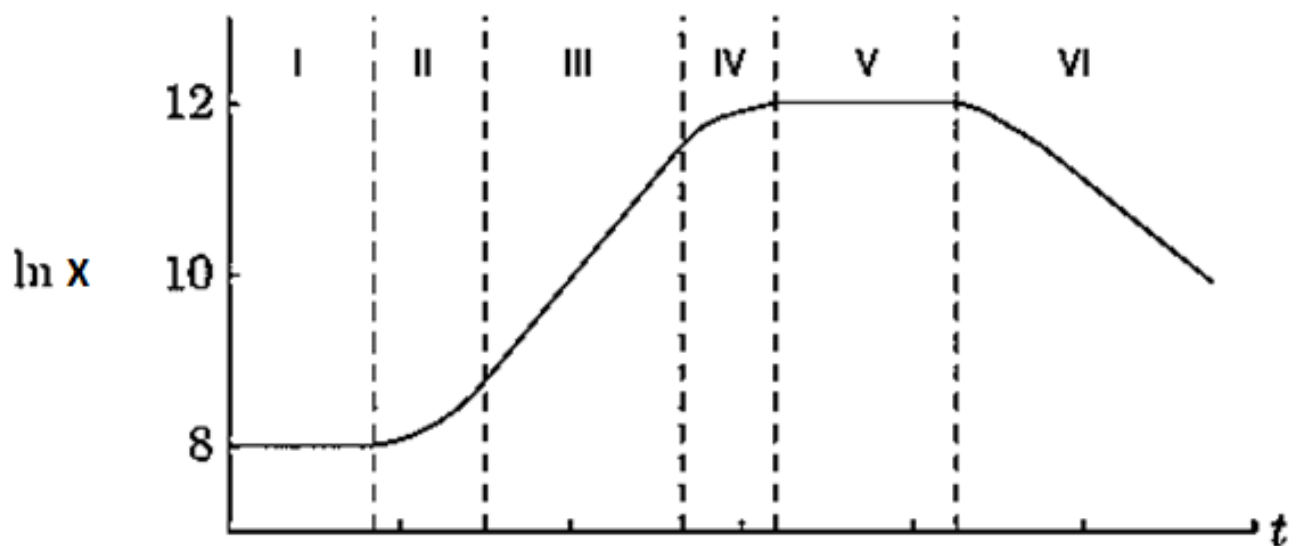


Fig 7. Curva característica de crecimiento y consumo de sustrato en un cultivo por lote: I) fase lag, II) fase de crecimiento acelerado, III) fase de crecimiento exponencial, IV) fase de crecimiento desacelerado, V) fase estacionaria y VI) fase de muerte.

Lee, 1992.

La siguiente fase es conocida como fase exponencial (III) o de crecimiento exponencial porque la velocidad de crecimiento de las células es proporcional a la concentración de las células. En esta fase las células se dividen con rapidez máxima porque todas las rutas enzimáticas para metabolizar el medio están operando y las células pueden aprovechar los nutrientes con eficiencia óptima (Lee, 1992).

Después de que las tasas de crecimiento alcanza un máximo, es seguido por la fase de desaceleración (IV) de la tasa de crecimiento y la tasa de división, esta fase es importante porque el crecimiento está “equilibrado” y la rapidez de crecimiento varía en función de la concentración de sustrato residual en cultivos limitados por el sustrato.

El crecimiento de la población microbiana es normalmente limitado ya sea por el agotamiento de los nutrientes disponibles o de la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Como consecuencia, la tasa de crecimiento disminuye y el crecimiento finalmente se detiene. A este punto del cultivo se conoce como fase estacionaria (V). La transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria involucra un periodo de crecimiento desbalanceado durante el cual varios componentes celulares son sintetizados a tasa desiguales. Consecuentemente, las células en fase estacionaria tienen una composición química diferente de las células en fase exponencial. Muchos productos en el cultivo microbiano se generan en esta fase.

La fase estacionaria es usualmente seguida por la fase de muerte (VI) en la cual los organismos de la población mueren. Se produce la muerte ya sea por el agotamiento de las reservas de energía celulares, o la acumulación de productos tóxicos. Como el crecimiento, la muerte es una función exponencial. En algunos casos, el organismo no solamente muere sino también se desintegran, mediante un proceso conocido como lisis (Lee, 1992).

La cinética de formación de biomasa y la producción de GA₃ por *G. fujikuroi* fueron estudiadas por primera vez por Borrow y col. (1964). Durante el crecimiento exponencial el consumo de glucosa, nitrógeno y fosfato es directamente proporcional a la acumulación de peso seco. La concentración de nitrógeno limita la formación de biomasa pero el peso seco continúa incrementándose debido a la acumulación de

lípidos, carbohidratos y polioles. La producción de GA₃ comienza cuando el nitrógeno es limitante en el medio de cultivo. En esta fase, además de la producción de GAs, inicia la producción de otros metabolitos secundarios como bikaverinas y carotenoides. La fase de mantenimiento es la etapa donde se produce la mayor concentración de GA₃.

Se han establecido la existencia de seis fases en el transcurso del cultivo microbiano con *G. fujikuroi* utilizando medio con glucosa como fuente de carbono y limitado de nitrógeno (Kumar y Lonsane, 1989):

1. Fase de latencia

La fase lag (de latencia) no es detectable en un medio limitado de nitrógeno, ya que la cepa requiere de muy poca o ninguna adaptación, y el crecimiento comienza rápidamente debido al uso de células con crecimiento vigoroso (inóculo). Esta fase es detectable cuando se usa en el medio acetato de amonio o un medio rico en carbohidratos que contienen más del 30 % en glucosa (Kumar y Lonsane, 1989; Uscanga-Reynell, 2002).

2. Fase de balance

Periodo de crecimiento exponencial en el cual el consumo de nutrientes es directamente proporcional a la acumulación de peso seco y se extiende hasta el momento en el que se agota la fuente de nitrógeno o algún otro nutriente, involucra un periodo de rápido crecimiento y consumo de nutrientes. El crecimiento es exponencial en las fases iniciales, siendo posteriormente lineal debido a los cambios provocados por la restricción de oxígeno. La morfología y composición de las hifas permanece constante y no existe la producción del ácido giberélico (Kumar y Losane, 1989; Uscanga-Reynell, 1992).

3. Fase de transición

En esta etapa cambia la composición micelial, continua el consumo de nutrientes y se incrementa proporcionalmente el peso micelial seco, pero sin embargo la velocidad de crecimiento y consumo de nutrientes son menores. El incremento del contenido de carbohidratos y grasa de las células es continuo en esta etapa hasta el agotamiento de glucosa en el medio. En un medio de cultivo limitado con fosfato y magnesio, la limitación de nutrientes ocurre antes de que comiencen las restricciones

de oxígeno. Consecuentemente la reserva intracelular de fosfato ácido-soluble o magnesio permite mayor proliferación de las células.

4. Fase de almacenamiento

En esta fase el peso seco continúa incrementándose linealmente debido a la acumulación de grasa y carbohidratos en las células y no a la proliferación del micelio. La presencia de glucosa en exceso y el agotamiento de nitrógeno causan el cese del crecimiento celular alcanzando la máxima acumulación de grasa y de carbohidratos, hasta 45 % y 32 % de peso seco, respectivamente. La grasa formada en las células consiste principalmente de triglicéridos saturados y en pequeñas concentraciones ácidos grasos y fosfolípidos. El consumo de sales en el medio continúa si éstas están presentes. El metabolismo secundario es activado e inicia la producción de giberelinas, bikaverinas y otros metabolitos. Debido a que el tiempo de terminación de esta etapa no es muy claro, un criterio adecuado es el tiempo en el cual se alcanza la concentración máxima del peso de micelio seco (Borrow y col., 1964; Kumar y Lonsane, 1989; Uscanga-Reynell, 1992).

5. Fase de mantenimiento (estacionaria)

Esta fase comprende el periodo en el que el peso micelial es máximo y la biomasa se mantiene constante hasta que la fuente de carbono y las reservas del hongo se agotan. La producción de ácido giberélico alcanza su máximo valor (Borrow y col., 1964; Kumar y Lonsane, 1989; Uscanga-Reynell, 1992).

6. Fase terminal

La fase terminal está caracterizada por incrementarse la vacuolación y pérdida del contenido celular presentando un decremento en el peso seco, existe ruptura de las hifas que provoca la liberación de sustratos al medio incrementando así los valores de pH (Borrow y col., 1964).

O. EXPRESIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN HONGOS

Con el desarrollo de las técnicas de secuenciación genética, la producción de metabolitos por hongos comenzó a realizarse bajo una nueva perspectiva cuando los investigadores comenzaron a entender que la producción de ciertos metabolitos esta relacionados con genes silenciosos que no pueden ser expresados a causa de

condiciones de cultivo inapropiadas. Nuevas estrategias han sido desarrolladas para solucionar esta incógnita, entre ellas, las herramientas clásicas y epigenéticas aplicadas para diversificar y producir metabolitos fúngicos de las vías metabólicas silenciosas.

En hongos, los genes responsables de la producción de metabolitos se agrupan en *clusters* (grupos de genes juntos en los cromosomas). Los modernos logros del genoma mostraron que, aunque el hongo posee la habilidad de producir un gran número de metabolitos, la mayoría de los *clusters* responsables de la regulación de rutas biosintéticas permanecen en silencio dentro de los patrones de cultivo comúnmente empleados en los laboratorios de investigación (Aparecida-Takahashi y col., 2013).

Teniendo en cuenta la suposición de que incluso pequeñas alteraciones en el medio de cultivo modula la biosíntesis de metabolitos secundarios, algunas estrategias fueron desarrolladas para maximizar la productividad del metabolito fúngico variando las condiciones de cultivo y la composición del medio. El adecuado medio de cultivo y las condiciones óptimas de crecimiento juegan un rol importante en el crecimiento del hongo y la formación del micelio, consecuentemente influye en la eficiente biosíntesis de metabolitos secundarios, que a menudo resulta en la producción de metabolitos considerados inusuales en la biosíntesis natural (Aparecida-Takahashi y col., 2013).

Rios-Irribé (2003) utilizó la técnica de despliegue diferencial para comparar la expresión de genes del hongo *G. fujikuroi* al ser cultivado en dos diferentes fuentes de carbono, glucosa y aceite de arroz. Con este método fue posible desplegar una población completa de ARNm concluyendo que la expresión de genes de *G. fujikuroi* depende de la fuente de carbono utilizada durante el cultivo. Este estudio a nivel molecular demostró el impacto que conlleva el solo variar la fuente de carbono, encontrando diferencias en la expresión de genes o patrón genético.

1. Metabolitos secundarios

Algunos hongos y actinomicetos poseen vías metabólicas para la biosíntesis de compuestos que no parecen tener ningún papel esencial en el crecimiento del organismo productor, estas rutas secundarias conducen a la producción de

metabolitos secundarios y su síntesis depende de precursores y energía generados a través del metabolismo primario.

Los metabolitos secundarios presentan diversas características (Vining, 1992):

- ✓ No son esenciales para su crecimiento del microorganismo productor pero es probable que le confiera ventajas de supervivencia en la naturaleza y competir más efectivamente con otras formas de vida.
- ✓ Son moléculas sintetizadas solo por algunos microorganismos.
- ✓ Conforman un amplio conjunto de estructuras químicas con diversas actividades biológicas.
- ✓ Poseen estructuras sofisticadas, mecanismos de regulación y vías energéticamente costosas y complejas.
- ✓ Se derivan de rutas biosintéticas únicas de intermediarios y metabolitos primarios; estas vías son frecuentemente largas y complejas.

La biosíntesis de muchos metabolitos secundarios fúngicos como el GA₃ no está relacionada con el crecimiento del microorganismo por lo que no son producidos durante la fase de crecimiento rápido o trofofase, debido a que las enzimas responsables para su biosíntesis están reprimidas en esta fase debido a que algunos de ellos tienen un impacto negativo en el microorganismo cuando se exponen durante un período de crecimiento rápido, pero se forman durante una etapa subsecuente conocida como idiofase por lo que también son conocidos como idiolitos (Drew y Demain, 1977; Wang y col., 1979). La regulación del metabolismo secundario puede retrasar su síntesis hasta después del crecimiento, lo que permite al organismo obtener una ventaja selectiva sin la desventaja de efectos autotóxicos (Drew y Wallis, 1983).

La formación de los metabolitos secundarios está sujeta a un control fisiológico general que responde a los factores ambientales. Existe evidencia suficiente donde se muestra que el metabolismo secundario tiene una prioridad menor que el crecimiento (Cane, 1994), cuando los microorganismos se cultivan en un medio rico y balanceado de nutrientes, estos no producen metabolitos secundarios, o si lo hacen, es a un nivel de potencial bajo. La formación del metabolito usualmente empieza cuando algún nutriente se agota en el medio de cultivo.

La biosíntesis de GAs en *G. fujikuroi* comienza después del agotamiento de la fuente de nitrógeno (Rybakov y Bourd, 1991; Sánchez-Fernández y col., 1997; Giordano y col., 1999). Condiciones limitadas de nitrógeno son necesarias para inducir las más altas concentraciones de GA₃ debido a que su formación es la de un típico metabolito secundario que se produce bajo requerimientos de crecimiento desbalanceado (Borrow y col., 1964; Tudzynski, 1999).

El nitrógeno no solo influye en la producción de metabolitos de interés, sino afecta a los diferentes mecanismos metabólicos de *G. fujikuroi*, como son el crecimiento y consumo de nutrientes. Existen algunas hipótesis sobre cómo afecta el agotamiento de nitrógeno al metabolismo de los microorganismos. Candau y col. (1991) reportaron que después de agotarse el nitrógeno el incremento observado en la biomasa era resultado de la acumulación de lípidos y carbohidratos. Esto fue confirmado por Jacklin y col. (2000) en *Fusarium moniliforme* quienes suministraron sesamol (inhibidor en la síntesis de lípidos) al medio de cultivo. El experimento libre de sesamol, exhibió la acumulación celular de lípidos, en el rango 5-35 % durante el periodo de crecimiento de cultivo ocurrido de 20-100 h.

Bent y Morton (1963) cultivaron *Penicillium griseofulvum* en un medio glucosamoníaco y observaron que cuando se agota la fuente de nitrógeno el hongo continua creciendo en tamaño y peso seco esto a expensas de la glucosa residual del medio. También indicaron que el micelio puede continuar creciendo y esporular sin una fuente de nitrógeno externa, y que los sistemas de proteinasas intracelulares están presentes. El agotamiento de nitrógeno no limita el aumento de biomasa y esto no necesariamente representa crecimiento celular del microorganismo. El cese del crecimiento microbiano podría más estar ligado estrechamente con la fuente de fosfatos (Thomas y Dodson, 1968). En *G. fujikuroi* la biosíntesis de las GAs aparentemente no está regulada por la concentración de fosfato o la tasa de crecimiento (Giordano y col., 1999). Rios-Irribé (2011) concluyó que los fosfatos son esencial para el crecimiento del hongo *G. fujikuroi*, y para el inicio de la biosíntesis del metabolito secundario debido a que altas concentraciones puede reprimir el metabolismo secundario, inhibiendo por ejemplo, fosfatasas y oxigenasas.

IV JUSTIFICACIÓN

Actualmente en México es común la aplicación de giberelinas para acelerar el crecimiento y desarrollo de plantas en casi todos los cultivos en explotación, desde los granos básicos hasta las rentables hortalizas, lo cual ha llevado a una demanda comercial de esta fitohormona por su gran importancia agroindustrial. Por tanto, su producción biotecnológica es un tópico de interés científico, siendo el cultivo microbiano por *G. fujikuroi* la principal alternativa por la alta producción de GAs que puede secretar. Por ello, estrategias de cultivo como el uso de fuentes de carbono mixta deben ser investigadas para maximizar la producción del ácido giberélico y en un futuro a corto plazo poder implementar la tecnología de su producción en nuestro Estado, debido a que en Sinaloa la actividad económica predominante es la agricultura, lo cual la establece como una de las entidades federativas con actividad agrícola más importante del país.

V HIPÓTESIS

El uso de fuente mixta de carbono glucosa-aceite de maíz maximiza la producción de ácido giberélico con respecto a utilizar glucosa o aceite de maíz como única fuente de carbono en cultivos sumergidos de *G. fujikuroi* bajo condiciones limitadas de nitrógeno, empleando matraz agitado con deflectores y tapa de ventilación.

VI OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto de una fuente de carbono mixta glucosa-aceite de maíz sobre la producción de ácido giberélico con respecto a utilizar glucosa y aceite de maíz como única fuente de carbono durante el cultivo microbiano de *G. fujikuroi* con condiciones limitadas de nitrógeno.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar experimentalmente las dinámicas de concentración de consumo de sustratos durante el cultivo de *G. fujikuroi* bajo condiciones limitadas de nitrógeno usando distintas fuentes de carbono en matraces con deflectores y tapa de ventilación.
2. Analizar la cinética de crecimiento de *G. fujikuroi*, cinética de consumo de sustratos y producción de ácido giberélico utilizando glucosa, aceite de maíz y fuente de carbono mixta glucosa-aceite de maíz bajo condiciones limitadas de nitrógeno.
3. Evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de ácido giberélico y biomasa utilizando matraces con deflectores y tapa de ventilación.
4. Realizar el análisis cinético bajo las tres condiciones de estudio mediante modelación matemática.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

1. Microorganismo

Se empleó el hongo *Gibberella fujikuroi* cepa H-984 (cultivo de la Colección Nacional de Cultivos Microbianos del CINVESTAV-IPN, México) el cual fue proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Celaya (**Fig 8**).

2. Conservación

Para su conservación, el hongo fue resembrado cada dos meses en tubo inclinado con agar papa-dextrosa (PDA) no comercial, se incubó durante 6 días a 27 °C y posteriormente fue almacenado a 4 °C en refrigeración (**Fig 8**).

3. Reactivos

Se emplearon como disolventes acetato de etilo ACS, metanol HPLC y n-hexano 95% ACS (Fermont). Los reactivos empleados fueron: aceite de maíz comercial (Maceite) y cloro comercial (Cloralex), ácido amino-naftol-sulfónico, nitroprusido de sodio (Fluka analytical), citrato de sodio tribásico hidratado, fenol, fosfato de potasio monobásico, hidróxido de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio, tartrato de sodio y potasio (Sigma-Aldrich), agar bacteriológico (J.T. Baker), extracto de levadura (BDBioxon), ácido dinitrosalicílico (DNS)(Sigma Life Science), molibdato de amonio tetra hidratado (Vecte Química Fina), ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, alcohol etílico absoluto ACS, carbonato de calcio ACS, cloruro de amonio, dextrosa, molibdato de sodio, nitrato de amonio ACS, sulfato de magnesio ACS, sulfato de sodio anhidro, sulfato de zinc ACS, sulfato ferroso ACS, sulfato manganeso monohidratado ACS (Fermont).

B. MÉTODOS

1. Medios de cultivo

a Agar dextrosa papa (PDA)

La técnica de preservación de *G. fujikuroi* fue el subcultivo, el cual consistió en la transferencia periódica del microorganismo en un medio nutritivo fresco (Ertola y col., 1995). El medio agar dextrosa papa es el más utilizado para el crecimiento de



Fig 8. Crecimiento macroscópico y microscópico del hongo *Gibberella fujikuroi*.

hongos y es conocido como PDA por sus siglas en inglés, tiene la infusión de papa como fuente de almidones y de dextrosa que son la base para el crecimiento de hongos. Este medio fue preparado en el laboratorio, se compuso de 300 g de trozos de papa sin cáscara, 20 g de dextrosa y 15 g de agar bacteriológico para un volumen total de medio de 1 L. La papa previamente pelada se picó en trozos medianos y se colocó en 800 mL de agua destilada en ebullición hasta su cocción (el criterio de cocción fue que al utilizar un objeto puntiagudo este debía perforar fácilmente un trozo de papa) sin que estos se deshicieran y se filtró el caldo obtenido en manta de cielo cuádruple. Los trozos de papa cocida se molieron hasta obtener un puré y se le realizaron sucesivos lavados con agua destilada hasta completar el volumen total. Posteriormente se añadió lentamente el agar bacteriológico para evitar grumos, se dejó en ebullición durante 1 min en una placa de calentamiento, después se retiró de la placa de calentamiento y se adicionó lentamente la dextrosa para asegurar una disolución completa. Inmediatamente después se colocaron 5 mL del medio preparado en tubos de ensayo con tapa rosca de 10 mL. Finalmente se colocaron en la autoclave (Yamato SK100C) y se esterilizaron a 15 psi y 121 °C por 15 min.

b Medio de propagación

La preparación del inóculo implica el desarrollo de una población de microorganismos desde su estado de conservación hasta obtener una suspensión de microorganismos viables, aptos para reproducirse y producir metabolitos a escala industrial. Cuando se prepara el inóculo, se busca que deje su etapa de “bajo metabolismo” y se adapte a las condiciones de cultivo, para lo cual se utiliza un medio específico (Ertola y col., 1995). Para la preparación del inóculo se utilizó el medio constituido por 20 g de glucosa, 3 g de extracto de levadura, 2.5 g de NH_4NO_3 , 0.5 g de KH_2PO_4 , 0.1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de CaCO_3 para 1 L de medio (Uscanga-Reynell, 1992; Escamilla-Silva y col., 1999). En 400 mL de agua destilada se añadieron uno por uno los reactivos en el orden mencionado (disolviéndolos cada uno perfectamente antes de agregar el siguiente reactivo) excepto el CaCO_3 (sal insoluble), se aforó y se separó el medio de cultivo en matraces Erlenmeyer de 500 mL siendo el volumen de trabajo de 250 mL y finalmente se agregó el CaCO_3 . A los

matraces con el medio se les colocó un tapón (de gasa y algodón) y se esterilizaron en autoclave a 15 psi y 121 °C por 15 min.

c Medio de producción de GA₃

Durante el proceso de producción de metabolitos, la composición del medio de cultivo depende tanto del microorganismo que se empleará como del producto que se quiera obtener (Ertola y col., 1995). La composición del medio de cultivo que se utilizó dependió del diseño de experimentos ya que una de las variables de estudio fue la fuente de carbono. La concentración de la fuente de carbono fue en base a 40 g L⁻¹ de C. El medio de cultivo donde se utilizó solo glucosa como fuente de carbono contenía 100 g L⁻¹ y el medio que contenía solo aceite de maíz como fuente de carbono 54.8 g L⁻¹. Se utilizó la proporción de fuente de carbono mixta glucosa-aceite de maíz 1:2 reportada por Rios-Irribé y col. (2013) que brindó la mayor producción de GA₃, correspondiente a 13.3 g L⁻¹ C de glucosa (33.25 g L⁻¹): 26.7 g L⁻¹ C de aceite (36.4 g L⁻¹). El medio base contenía 1.5 g L⁻¹ de NH₄Cl, 3 g L⁻¹ KH₂PO₄, 1.5 g L⁻¹ MgSO₄•7H₂O y 2 mL L⁻¹ de solución de oligoelementos, la cual estuvo compuesta por: 1.0 FeSO₄•7H₂O, 1.5 Na₂MoO₄•2H₂O, 0.2 MnSO₄•H₂O and 1.0 ZnSO₄•7H₂O (Martínez-Torres, 2014). Se vertieron 250 mL del medio de cultivo en matraces Erlenmeyer con deflectores, se les colocó un tapón de algodón y se esterilizaron a 121 °C durante 15 min a 15 psi.

2. Desarrollo del cultivo microbiano

El cultivo de microorganismos (**Fig 9**) consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que los microorganismos puedan multiplicarse de forma controlada. Como primer paso se preparó un inóculo a partir una suspensión homogénea de células de *G. fujikuroi*. El uso de conidias en los bioprocesos permite obtener un inóculo inicial uniforme y homogéneo a diferencia del uso del micelio vegetativo como inóculo estándar (Uscanga-Reynell, 1992). Se tomó un tubo inclinado con medio PDA en el que era conservado el hongo y se le adicionaron 5 mL de una solución de NaCl al 0.9 %, con una asa bacteriológica se removió el micelio previamente desarrollado y se homogenizó. A 250 mL del medio de propagación estéril se le adicionó 2 mL de la suspensión homogénea obtenida y se propagó durante 38 h y agitación constante a 280 rpm (LAB-LINE INSTRUMENTS).

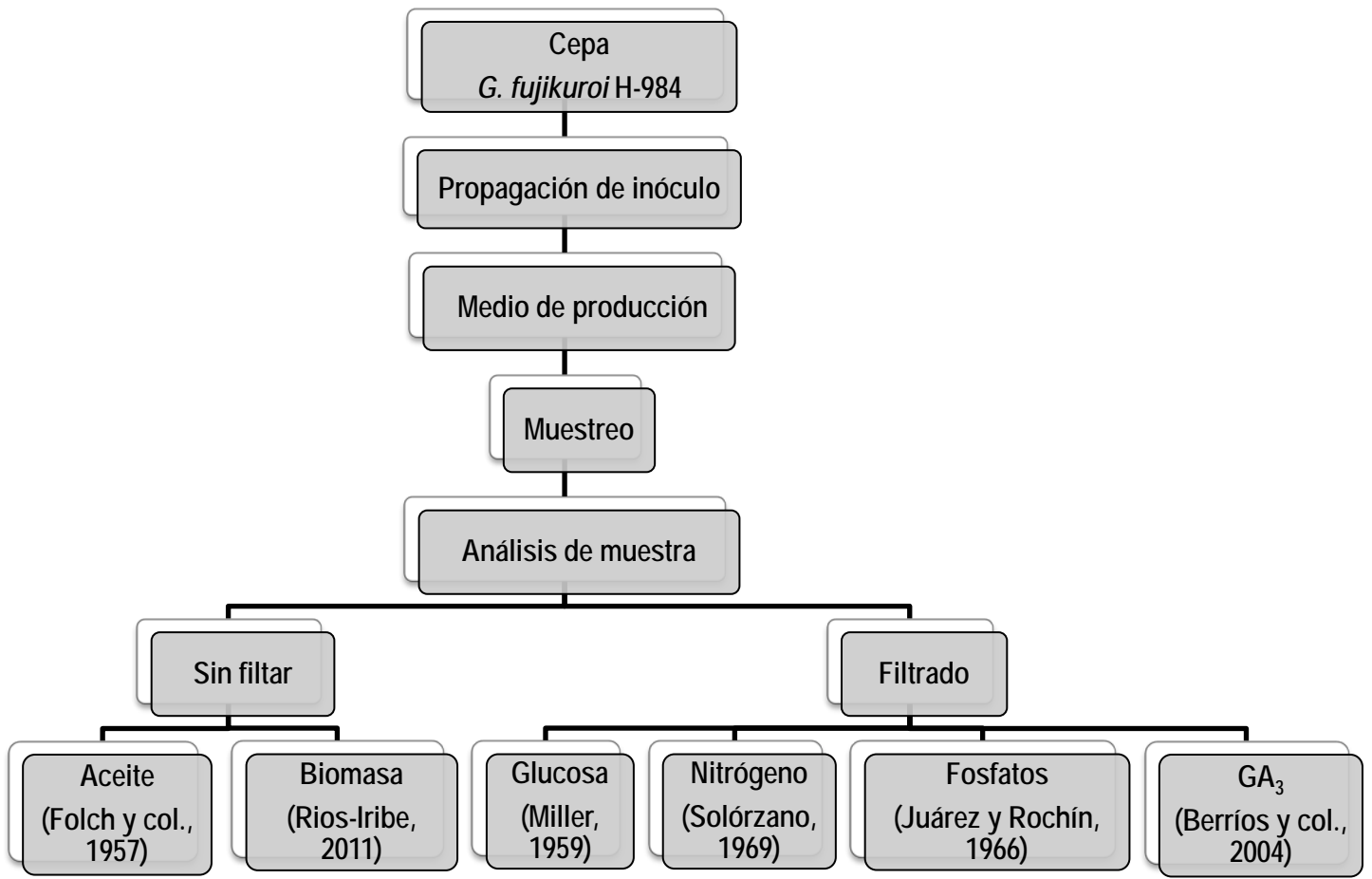


Fig 9. Estrategia general del bioproceso.

Los experimentos donde se probaron las diferentes fuentes fueron realizados por lotes, en medio líquido. Se utilizaron matraces Erlenmeyer (**Fig 10**) de policarbonato de capacidad de 500 mL y tapa de ventilación de polipropileno que cuentan con una membrana permeable de 0.22 μm de tamaño de poro para permitir el intercambio gaseoso constante y además garantizar su esterilidad. Están equipados con 4 deflectores en forma simétrica situados en la parte inferior del matraz para el mezclado y lograr la máxima transferencia de oxígeno al medio de cultivo. El medio de producción se inoculó en una relación inóculo-medio de cultivo del 5 %. Estos experimentos se mantuvieron en agitación constante durante 288 h a 280 rpm.

3. Diseño de experimentos

El diseño de experimento fue bifactorial de efectos fijos completamente aleatorizado. Las variables de proceso estudiadas fueron la fuente de carbono con 3 niveles y el tiempo de cultivo con 17 niveles. Los niveles de fuente de carbono fueron: glucosa, aceite de maíz y su mezcla en proporción 1:2. Los niveles de tiempo de cultivo fueron: 12, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264 y 288 horas. Las variables de respuesta fueron la concentración de ácido giberélico (g L^{-1}) y biomasa (g L^{-1}) producidas por *G. fujikuroi*. Se obtuvieron 51 tratamientos. De cada tratamiento se realizaron 3 réplicas. A los datos experimentales se les realizó un análisis de varianza y comparación de medias de los tratamientos utilizando la prueba de Tukey. El análisis estadístico se realizó en el software comercial Minitab versión 16 (Minitab Inc., 2012).

4. Muestreo

Para dar seguimiento al consumo de sustratos (glucosa, aceite, nitrógeno y fosfatos), crecimiento del microorganismo (biomasa) y producción de GA_3 se tomó muestras a las 0, 12, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264 y 288 h. En cada tiempo de muestreo se retiró un volumen de 5 mL del medio de cultivo en tubos cónicos graduados estériles de 15 mL. Cuando se tomó muestra para determinar GA_3 se retiró el doble de volumen. Inmediatamente después de tomar la muestra se extrajo el aceite con hexano y después se filtró. El filtrado fue recuperado en tubos cónico graduados estériles de 50 mL para su análisis.



Fig 10. Matraz con deflectores y tapa de ventilación.

5. Extracción y determinación de aceite

La cantidad de aceite no consumido durante el cultivo se determinó gravimétricamente. Las muestras se centrifugaron a 3400 rpm durante 20 min para facilitar la separación de las fases y el aceite que se recuperó en la parte superior del tubo fue extraído con hexano (Folch y col., 1957). A cada muestra (5 mL) se le realizaron 2 lavados con 6 mL de hexano durante 10 min. El hexano con el aceite extraído se recuperó en viales previamente etiquetados y puestos a peso constante por calentamiento a 90 °C por 4 h, y se colocaron en el desecador por 20 min y se registró su peso (P1). Posteriormente el hexano se eliminó en un concentrador centrífugo a vacío (Speed Vac Concentrator) a 50 °C por 40 min. Los viales con el aceite se llevaron a peso constante nuevamente a 60 °C durante 12 h, después fueron colocados en el desecador durante 20 min y finalmente se pesaron y se registró su peso (P2). El aceite no consumido fue calculado de la siguiente forma:

$$\text{Aceite no consumido} = (P2 - P1) / V$$

Donde:

P1= Peso del vial (g)

P2= Peso del vial + aceite (g)

V= Volumen de muestra (L)

6. Determinación de biomasa

La determinación de la biomasa es una de las variables más importantes de un bioproceso ya que su determinación nos lleva a la comprensión de la eficiencia del mismo. Se trata de una variable clave para establecer la tasa de producción, de consumo de nutrientes y el cálculo de balance de masas de cualquier proceso biológico. El crecimiento celular es una variable de proceso difícil de cuantificar en hongos. La concentración celular se evaluó empleando un método gravimétrico, en términos de peso seco por unidad de volumen. Esta técnica se emplea principalmente para microorganismos que crecen en forma micelial, debido a que es difícil cuantificar las células individuales. La biomasa se recuperó del medio de cultivo

previamente se le extrajo el aceite, la muestra se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm tamaño de poro y 47 mm de diámetro, se empleó equipo de filtración y una bomba de vacío para acelerar la filtración. Las membranas etiquetadas se llevaron a peso constante a 90 °C durante 4 h en una estufa. Se colocaron en el desecador durante 20 min y se registró su peso (P1). La muestra se filtró a través de la membrana. La membrana con la biomasa se llevó a peso constante como se mencionó anteriormente. Posteriormente, estas membranas se colocaron en hexano durante 12 h para eliminar restos de aceite, se llevaron a peso constante y se registró su peso (P2). El filtrado se recuperó en tubos cónicos graduados de 50 mL y se conservó en refrigeración a 4 °C para análisis posteriores (Rios-Irribé y col., 2011). La biomasa total se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Biomasa} = (P2-P1) / V$$

Donde:

P1= Peso de la membrana (g)

P2= Peso de membrana + biomasa (lavada con hexano) (g)

V= Volumen de muestra (L)

7. Determinación del sustrato residual

La glucosa, nitrógeno y fosfatos se determinaron por diferentes técnicas espectrofotométricas. Para poder determinar un compuesto por espectrofotometría, este debe absorber luz, y la absorción debe poder distinguirse de la de otras sustancias que pueda haber en la muestra; las medidas se deben hacer a la longitud de onda de máxima absorción del compuesto ya que en este punto la sensibilidad del análisis es máxima. La espectrofotometría se basa en la Ley de Lambert-Beer que establece que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de una especie absorbente. Empleando este método analítico se elaboró una curva de calibración el cual es una representación gráfica de la respuesta del método en función de cantidades conocidas del analito (llamadas patrones o estándares); que debe cubrir un intervalo adecuado de concentraciones, para luego interpretar la respuesta a cantidades desconocidas. Además se preparó un blanco, disolución que

contiene todos los reactivos y disolventes usados en el análisis, excepto el analito (Harris, 2007). Las metodologías para determinar los distintos sustratos fueron las siguientes:

a Determinación de glucosa

La cuantificación de glucosa se realizó en base a la metodología propuesta originalmente por Miller (1959) con algunas modificaciones. El método conocido como DNS se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (color amarillo naranja) por un azúcar reductor, el máximo de absorción del ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (color oscuro) está en 575 nm. La muestra (1 mL) se colocó en un tubo de reacción de 10 mL, se le añadió 1.5 mL de reactivo de Miller y se agitó vigorosamente. En la parte superior de cada tubo se colocó una tapa de aluminio perforada finamente. Los tubos se colocaron en un baño a ebullición por 10 min, para estabilizar el color obtenido se les agregó 1 mL de sal de Rochelle, inmediatamente se detuvo la reacción colocando los tubos en un baño con hielo durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 2 mL de agua destilada a cada uno de los tubos, se agitaron vigorosamente y se dejaron enfriar hasta que alcanzaron temperatura ambiente. La curva de calibración fue ajustada a un intervalo de concentración de 0-1 mg mL⁻¹ de glucosa (Ver anexo, **Fig 28**).

b Determinación de nitrógeno

Para la determinación de nitrógeno amoniacal residual en soluciones acuosas se utilizó la metodología reportada por Solórzano (1969) con algunas modificaciones. En este método el fenol y un agente oxidante, el hipoclorito alcalino, en presencia de un catalizador (nitroprusido de sodio) transforma el amonio en indofenol (reacción de Berthelot) el cual presenta un color azul intenso y puede determinarse espectrofotométricamente a 662 nm. La muestra (1 mL) se colocó en un tubo de reacción previamente etiquetado. A cada una de las muestras se le adicionó 1 mL de la solución A (fenol) y 1 mL de la solución B la cual cataliza la reacción, se agitó vigorosamente después de agregar cada solución. Inmediatamente se adicionó 2 mL de la solución D (solución oxidante) con una diferencia de 1 min entre cada tubo para garantizar un tiempo de reacción exacto de 30 min para cada muestra y se registró la

absorbancia. La ecuación de recta fue ajustada a 9 puntos en el intervalo de 0 a 7 mg N₂ L⁻¹ (ver anexo, **Fig 29**).

c Determinación de fosfatos

La metodología para cuantificar fosfatos en soluciones acuosas fue la desarrollada por Juárez y Rochín (1966) con modificaciones. En este método el molibdato de amonio reacciona en medio ácido para dar fosfomolibdato (incoloro), que se reduce a un complejo intensamente colorido, el azul de molibdeno, cuya presencia puede detectarse en un espectrofotómetro a 690 nm. La muestra (5 mL) se colocó en un tubo de reacción y se le agregó 200 µL de molibdato de amonio, se agitó vigorosamente y se le adicionó 200 µL de la solución ácido amino-naftol-sulfónico, se dejó reaccionar por 5 min y se tomó la lectura de absorbancia a 690 nm (Spectronic 200). Los puntos de calibración fueron en el intervalo de 0-25 mg L⁻¹ de fosfatos (ver anexo, **Fig 30**).

8. Extracción y determinación de GA₃

La extracción líquido-líquido es un método muy útil para separar componentes de una mezcla. Este método depende de la diferencia de solubilidad del compuesto a extraer en dos disolventes inmiscibles. La extracción de un compuesto de una mezcla acuosa se puede conseguir añadiendo un disolvente orgánico. Cuando se agita el compuesto con los dos disolventes aumenta la superficie de contacto entre ellas y se produce la transferencia del producto deseado desde la fase inicial hacia la segunda fase. Puesto que las densidades son diferentes en el equilibrio, se separarán al cesar la agitación y se formará entre ellas una interfase donde se diferencian las fracciones y la posición de las fases dependerá de la relación de las densidades. La fase inicial puede contener todavía una cantidad del compuesto a extraer, para optimizar la extracción se repite el proceso con el disolvente orgánico puro. Para separar el GA₃ del filtrado se realizó una extracción líquido-líquido simple empleando como disolvente orgánico el acetato de etilo (el cual es muy volátil y posee un bajo punto de ebullición, facilitando la posterior separación del GA₃). Como primer paso se colocó la muestra (5 mL) en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se le agregó 10 mL de acetato de etilo, se colocó sobre una placa de agitación, se mantuvo en agitación constante durante 10 min evitando salpicaduras. Se transfirió a

un embudo de separación y la fase orgánica se recuperó en un tubo cónico graduado de 50 mL y a la fase acuosa se le realizó una segunda extracción con 8 mL de acetato de etilo como se mencionó anteriormente. Terminada la segunda extracción se desechó la fase acuosa y la fase orgánica fue recuperada. El embudo de separación se lavó con 2 mL de acetato de etilo para recuperar el GA₃ que se pudo quedar adherido en las paredes de este. Las fracciones orgánicas se combinaron obteniendo un volumen total de extracción de 20 mL. A la extracción obtenida se le agregó 1.5 g de sulfato de sodio anhidro una sal desecante para eliminar la fase acuosa que no había sido eliminada y se transfirieron a viales etiquetados. Los viales con las extracciones fueron colocados en un concentrador a 35 °C durante 2 h 10 min (Speed Vac Contrator) para eliminar el disolvente. El ácido giberélico concentrado fue resuspendido en 1.5 mL de metanol grado HPLC para su posterior determinación.

El contenido de GA₃ se realizó por espectrofotometría siguiendo la técnica reportada por Berríos y col. (2004) con algunas modificaciones. Este es un método cuantitativo rápido para la determinación del GA₃ basado en la conversión del ácido giberélico a ácido giberelénico (GE), el cual absorbe fuertemente en la región ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm (Holbrook y col., 1960). Este método consiste en la adición de HCl, que al reaccionar con la muestra convierte el GA₃ a GE. La velocidad inicial de conversión de GA₃ a GE es lineal al menos hasta 2 min, y la pendiente de la línea de conversión está relacionada con la concentración inicial de GA₃ en la muestra (ver anexo, **Fig 31**).

En un tubo de reacción de 5 mL se colocaron 350 µL de metanol grado HPLC y la muestra (50 µL), se le agregó 1.4 mL de HCl 3.75 M, inmediatamente se agitó vigorosamente en vortex durante 10 s y se comenzó la lectura a los 20 s y cada 20 se registró la absorbancia durante 2min en un espectrofotómetro (GENESYS 10). El blanco de referencia fue metanol grado HPLC en lugar de muestra. La curva de calibración se realizó en el intervalo de 100-1000 mg L⁻¹ de GA₃ (ver anexo, **Fig 32**).

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el estudio actual, se desarrolló una estrategia de cultivo empleando sustratos mixtos de carbono para mejorar la concentración de GA₃ y productividad por *Gibberella fujikuroi* cepa H-984. Se estudiaron los efectos de glucosa, aceite de maíz y su mezcla en la producción de GA₃, con el objetivo de mejorar la eficiencia de la producción de ácido giberélico bajo condiciones limitadas de nitrógeno. Para lo cual se realizaron cultivos *batch* en matraces con deflectores y tapa de ventilación en base a 40 g L⁻¹ de carbono. Para la fuente mixta glucosa-aceite de maíz se utilizó la proporción 1:2.

Las **Fig 11, 12, 13, 14, 15 y 16** muestran la evolución de los cultivos microbianos donde se utilizaron distintas fuentes de carbono para la producción de GA₃. Dichas figuras muestran las cinéticas de producción de biomasa y GA₃, las cinéticas de consumo de los sustratos glucosa, aceite de maíz, nitrógeno y fosfatos. Cada uno de los datos graficados representa el promedio de tres experimentos y además se presenta la variabilidad entre los datos. En las **Fig 11 y 12** se muestran los datos obtenidos para el medio de cultivo donde se utilizó glucosa como única fuente de carbono; en las **Fig 13 y 14** se pueden observar los datos obtenidos donde se utilizó solo aceite de maíz como fuente de carbono; y las **Fig 15 y 16** muestran los datos donde se utilizó la fuente mixta glucosa-aceite de maíz. Los resultados obtenidos son más detallados en los apartados A-F.

El tiempo de cultivo en que se realizó la toma de muestra para su análisis fue bajo una estrategia de observar a detalle el comportamiento del microorganismo durante el consumo de los sustratos utilizados durante las tres condiciones de estudio así como su crecimiento. En todas las figuras antes mencionadas se puede observar que los principales cambios en el comportamiento cinético durante estas condiciones de cultivo fueron más perceptibles durante las primeras 72 horas de cultivo, por ello la importancia de acortar los tiempos de muestreo en ese periodo.

Los datos de GA₃ se graficaron a partir de las 72 horas debido a que la técnica espectrofotométrica empleada tiene un rango de sensibilidad a partir de los 100 mg L⁻¹ por lo que no fue posible darle certidumbre a las muestras con menor concentración.

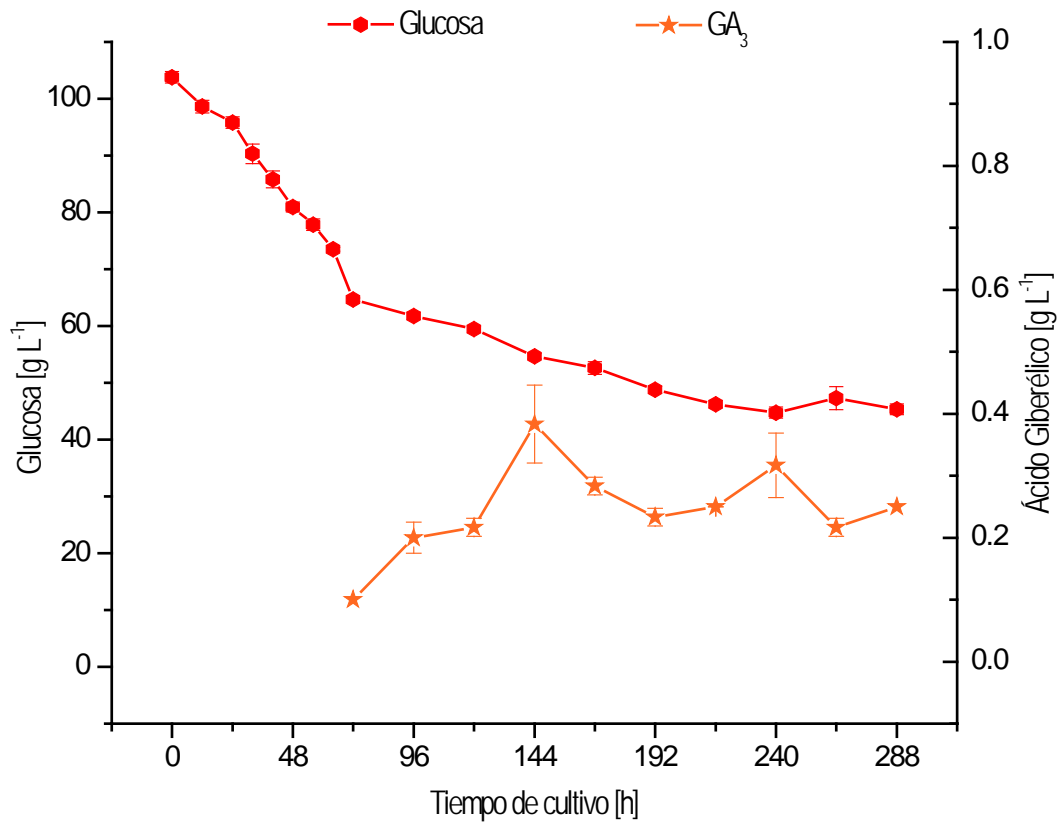


Fig 11. Cinéticas de producción de ácido giberélico y de consumo de la fuente de carbono en el medio donde se utilizó solo glucosa.

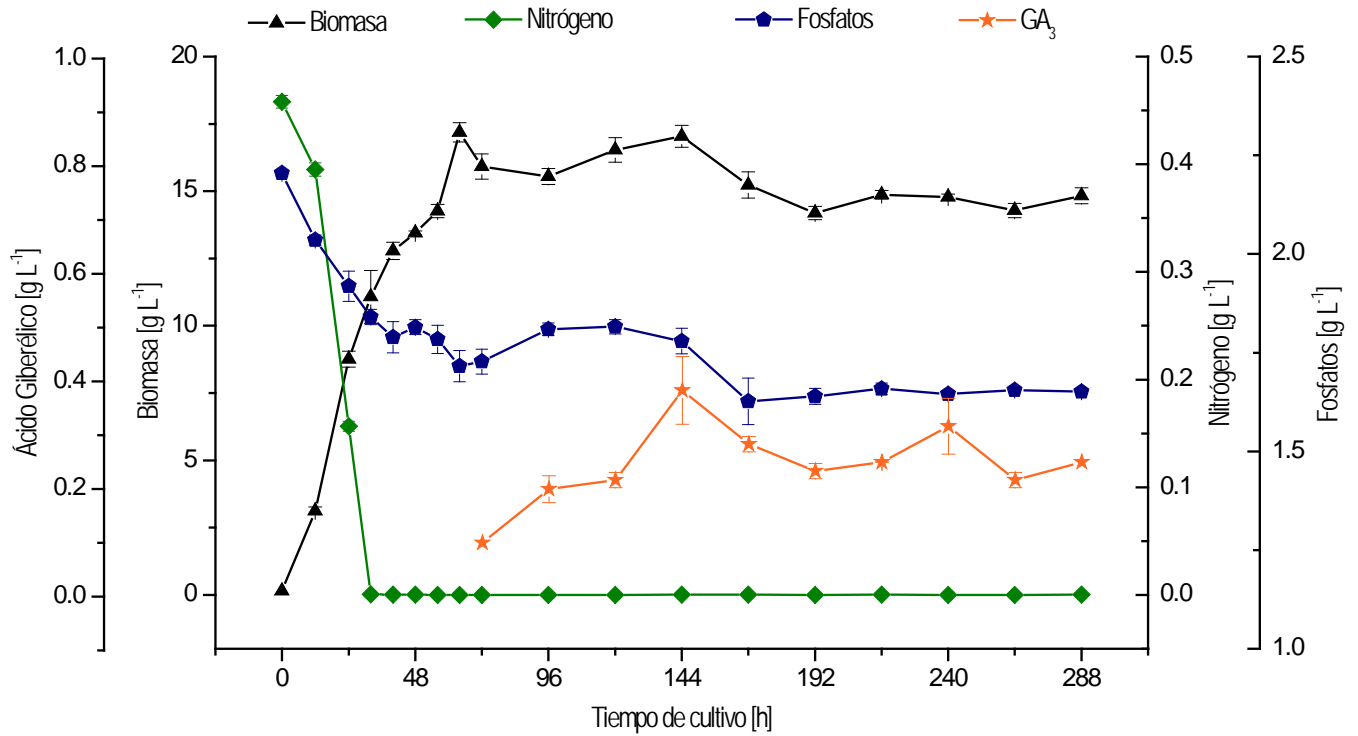


Fig 12. Cinéticas de producción de biomasa y ácido giberélico y cinéticas de consumo de los sustratos nitrógeno y fosfatos utilizando glucosa como fuente de carbono.

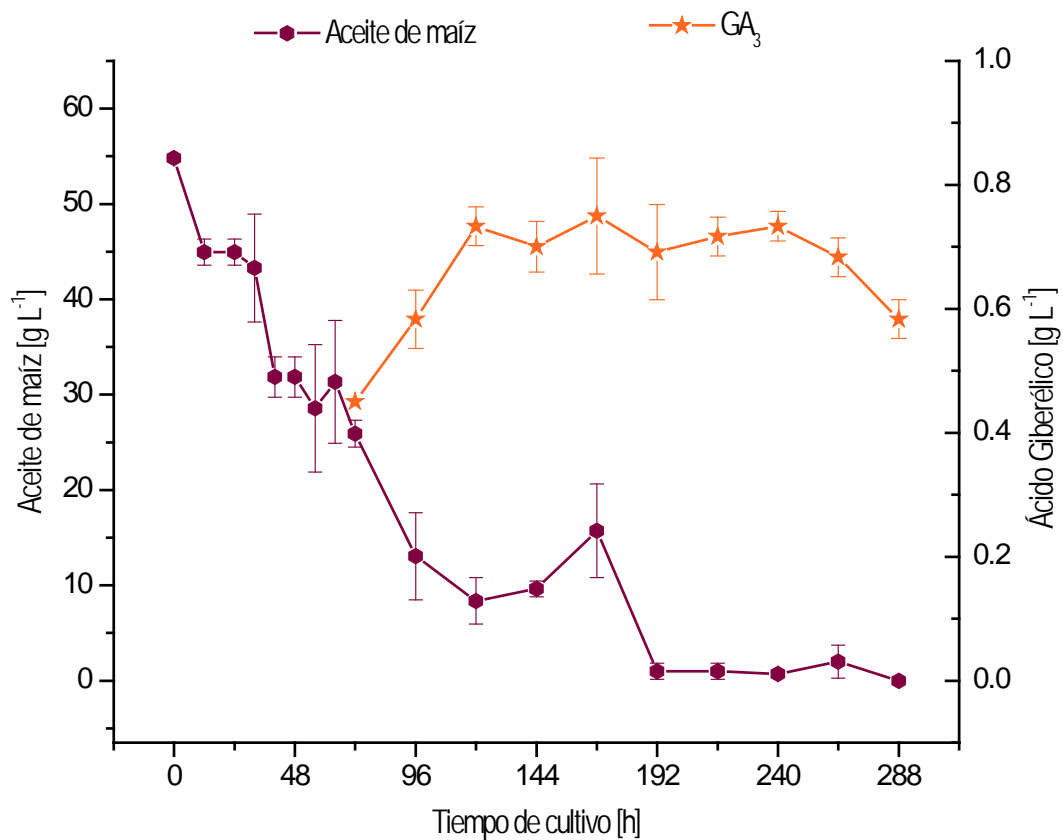


Fig 13. Cinéticas de producción de ácido giberélico y consumo de la fuente de carbono en el medio donde se utilizó solo aceite de maíz.

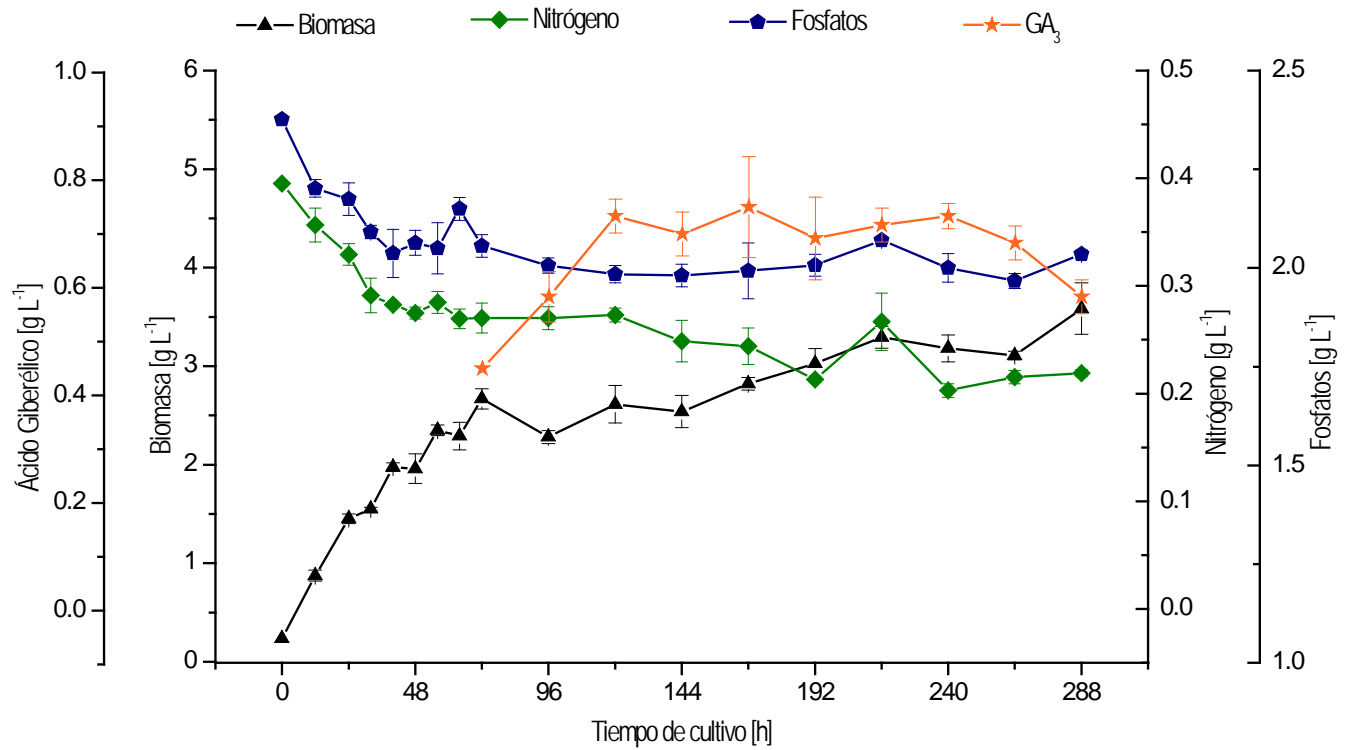


Fig 14. Cinéticas de producción de biomasa y ácido gibérelco y cinéticas de consumo de los sustratos nitrógeno y fosfatos utilizando aceite de maíz como fuente de carbono.

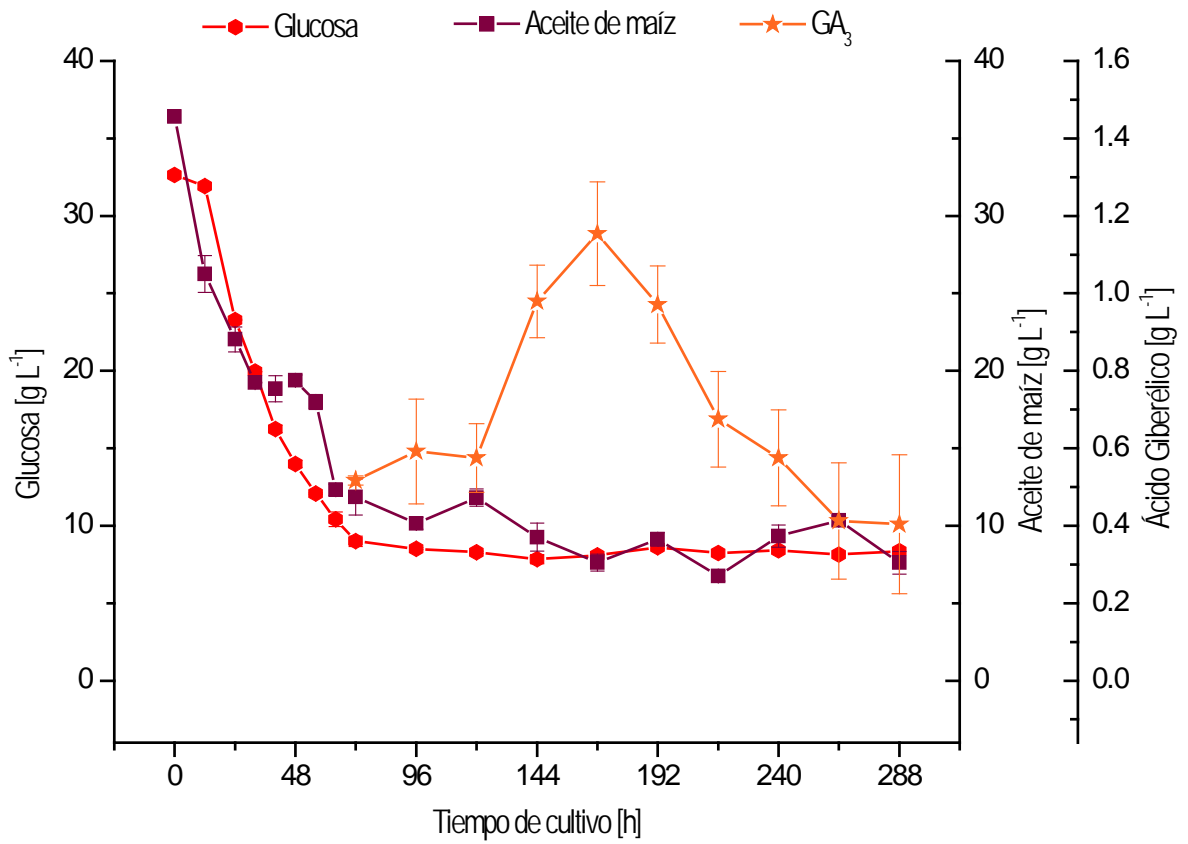


Fig 15. Cinéticas de producción de ácido giberélico y consumo de las fuentes de carbono en el medio donde se utilizó la mezcla glucosa-aceite de maíz en proporción 1:2.

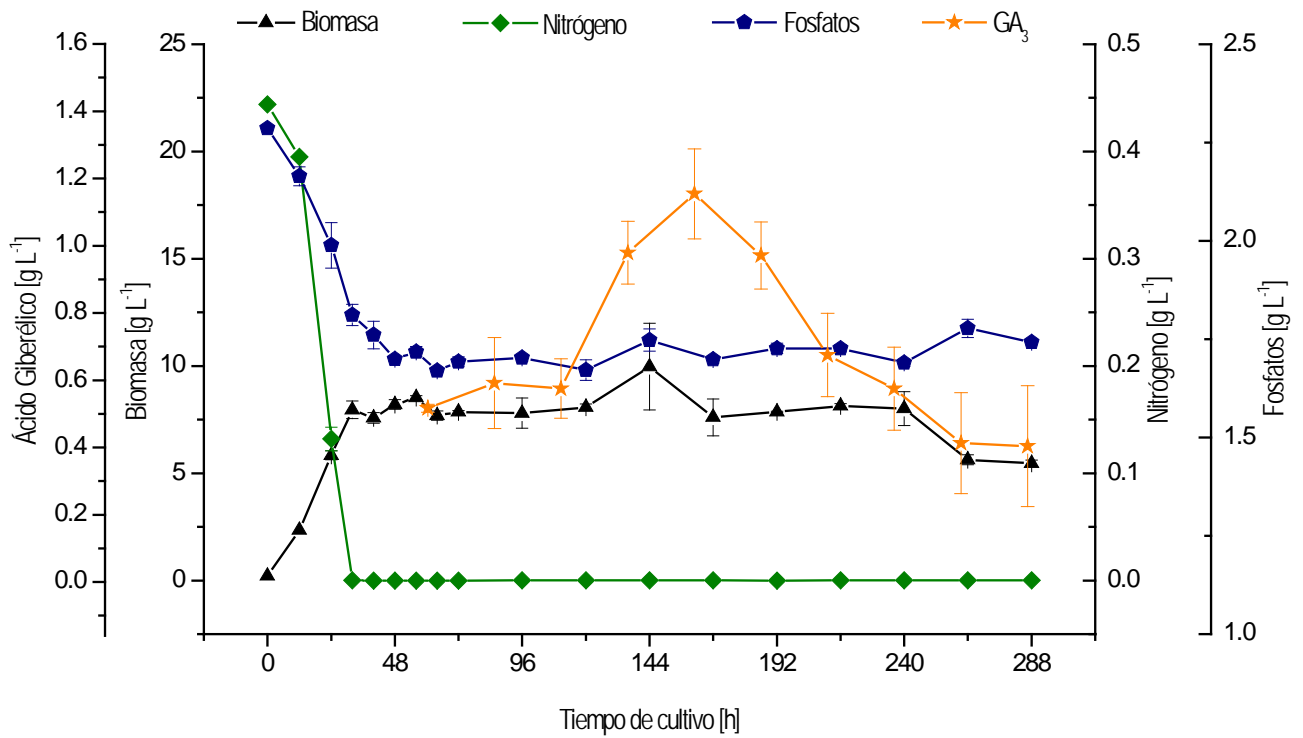


Fig 16. Cinéticas de producción de biomasa y ácido giberélico y cinéticas de consumo de los sustratos nitrógeno y fosfatos utilizando fuente de carbono mixta glucosa-aceite de maíz proporción 1:2.

A. CINÉTICA DE CRECIMIENTO

El medio de cultivo basado en glucosa como única fuente de carbono fue con el que se obtuvo la mayor concentración de biomasa. El periodo de crecimiento exponencial se observó en las primeras 64 h alcanzándose una concentración de 17 g L^{-1} , a partir de este punto la concentración de biomasa se mantuvo constante por el resto del tiempo de cultivo observándose la fase estacionaria (**Fig 12 y 17**). En esta etapa la biomasa se mantiene agotando los nutrientes almacenados por *G. fujikuroi* y es de suma importancia para la producción de metabolitos secundarios ya que en esta etapa se alcanza la máxima producción de GA_3 (Borrow, 1964; Kumar y Lonsane, 1989; Negrete-Rodríguez, 2002; Rios-Irribé y col., 2011; 2013; Martínez-Torres, 2014).

Con aceite de maíz como única fuente de carbono el microorganismo creció más lentamente, por lo cual se obtuvo una baja tasa de crecimiento. La concentración máxima de biomasa se registró a las 288 h y fue de 3.5 g L^{-1} . En la cinética de producción de biomasa se observan dos fases de crecimiento; la primera fase de crecimiento se observó hasta la 72 h alcanzándose una concentración de 2.7 g L^{-1} y se mantuvo constante hasta las 144 h, tiempo en el que comienza la segunda fase de crecimiento. A las 288 h tiempo en el que terminó el periodo de muestreo establecido se registró un aumento de nuevo en la concentración de biomasa (**Fig 14 y 17**). El medio de cultivo donde se utilizó la fuente mixta glucosa-aceite de maíz, la fase de crecimiento exponencial se observó en las primeras 48 h y alcanzó una concentración de 8.5 g L^{-1} , a partir de ese tiempo la concentración de biomasa se mantuvo constante alcanzándose la fase estacionaria; y a partir de las 240 h se observó la fase de muerte (**Fig 16 y 17**).

Comparando las cinéticas de crecimiento de *G. fujikuroi* obtenidas se observó que la fuente de carbono influye en la concentración celular máxima alcanzada lo que concuerda con los resultados de Peacock y col. (2003) donde reportan que el crecimiento de la bacteria *Streptomyces lividans* está claramente influenciada por la fuente de carbono proporcionada. Bajo estas condiciones de estudio, la glucosa fue la fuente de carbono óptima para la producción de biomasa alcanzando una concentración 5 veces mayor que cuando se utilizó solo aceite de maíz. Con fuente

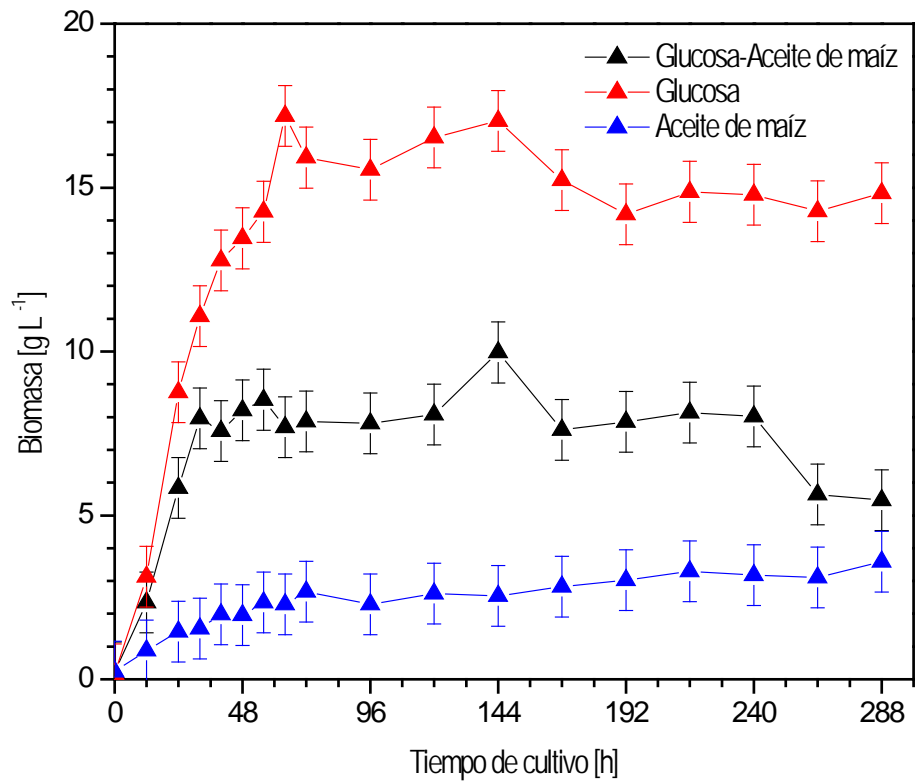


Fig 17. Cinéticas de crecimiento de *Gibberella fujikuroi* empleando diferentes fuentes de carbono [Barras corresponden al HSD (1.85319, $\alpha=0.05$) para comparación de medias correspondientes a las fuentes de carbono].

mixta glucosa-aceite de maíz se obtuvo una concentración dos veces menor con respecto a glucosa pero fue dos veces superior que cuando se utilizó aceite de maíz como única fuente de carbono. Esto puede deberse a que la glucosa es un sustrato rápidamente metabolizado y generalmente se logra la máxima tasa de crecimiento celular, pero en bioprocesos es usual que inhiba la producción de metabolitos secundarios (represión catabólica) (Marwick y col., 1999).

Además, la fase de crecimiento exponencial fue mayor cuando se utilizó glucosa con respecto a utilizar fuente mixta, por lo que es lógico que este medio haya producido mayor cantidad de biomasa y al utilizar fuente mixta la fase de crecimiento exponencial terminó 16 horas antes y la biomasa se redujo a la mitad. Al término de esta fase, en ambos experimentos la concentración de biomasa se mantuvo constante y se puede identificar claramente la fase estacionaria (**Fig 17**). El comportamiento de *G. fujikuroi* en el medio con aceite de maíz fue diferente a los otros dos medios, se observaron dos fases de crecimiento por lo que en la curva de crecimiento la fase estacionaria está seccionada.

Es importante resaltar que en ninguno de los experimentos se presentó fase lag (fase de latencia o de adaptación) por lo que el microorganismo inició el cultivo en crecimiento exponencial. A pesar de que el medio de propagación es diferente al medio de producción. El desarrollo previo de un inóculo es una estrategia para disminuir la fase lag durante el cultivo del microorganismo en un bioproceso (Ertola y col., 1995).

A los resultados de producción de biomasa obtenidos durante cada tratamiento realizado se les aplicó un análisis de varianza utilizando el Software Minitab Version 16 (Minitab Inc., 2012). Los resultados de dicho análisis estadístico se presentan en el **Cuadro 6**. El análisis bifactorial indica que el factor fuente de carbono y el tiempo de cultivo mostraron un efecto significativo sobre la producción de biomasa así como la interacción entre los factores.

B. CINÉTICA DE CONSUMO DE LA FUENTE DE CARBONO

Para conocer la cinética de consumo de la fuente de carbono, se determinó el contenido de glucosa y aceite en el medio de cultivo de cada punto de muestreo. La

Cuadro 6. Análisis de varianza para la producción de biomasa

FACTORES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A-Fuente de carbono	2058.48	2	1029.24	1734.93	0.0000
B-Tiempo de cultivo	657.83	17	38.70	65.23	0.0000
INTERACCIONES					
AB- Fuente de carbono-Tiempo de cultivo	319.42	34	9.39	15.84	0.0000
Residuo	32.04	54	0.59		
Total (corregido)	3067.76	107			

mayor tasa consumo de la fuente de carbono en los tres diferentes medios se presentó durante la fase de crecimiento exponencial (**Fig 17 y 18**).

En el medio con solo glucosa, *G. fujikuroi* durante esta etapa consumió el 66 % del consumo total y durante todo el cultivo gasto el 57 % del contenido inicial de glucosa, quedando una concentración residual de 45.3 g L⁻¹ (**Fig 11 y 18**).

Al inicio del cultivo microbiano el aceite no se emulsificó en el medio de cultivo, pero se mantuvo disperso con ayuda de la agitación y la aireación proporcionada por los matraces con deflectores y tapa de ventilación. En ocasiones estuvo más disperso y otras veces menos disperso, lo que de alguna manera afectó la determinación de la concentración de aceite en el medio de cultivo generando variabilidad en los datos debido a problemas de homogenización al momento de tomar muestra. La cinética de consumo de aceite de maíz muestra que las 72 h se observa el término de la primera fase de crecimiento exponencial, en la cual se consumió el 53 % de la concentración total de aceite. A partir de ese punto se registró consumo hasta las 192 h y en ese periodo el aceite fue consumido totalmente agotándose en el medio de cultivo (**Fig 13 y 18**).

Una de las desventajas de los medios de cultivo con aceite es que incluye un requerimiento de oxígeno más alto y además que es común que se presente un fenómeno conocido como "problema de aceite residual" (Peacock y col., 2003). Esto es observado en las fermentaciones para la producción de antibióticos donde los aceites son muy utilizados. Por ejemplo para la producción de actinorridina se ha utilizado el triacilglicérido simétrico trioleína como fuente de carbono y se ha observado que aproximadamente del 10-20 % de la concentración inicial de aceite añadida todavía estaba presente al final de los cultivos (Peacock y col., 2003). Este fenómeno puede presentarse debido a problemas con la disponibilidad del aceite, es decir, la formación de gotas y la forma en que entran en contacto con las células, o con la fisiología o bioquímica de las propias células. Las lipasas juegan un papel central en la hidrólisis del aceite, lo cual es necesario para la asimilación de los ácidos grasos. En esta investigación el fenómeno del "aceite residual" no fue observado en los cultivos con solo aceite de maíz, al consumirse este sustrato completamente, esto puede deberse a que los cultivos agitados en matraces con

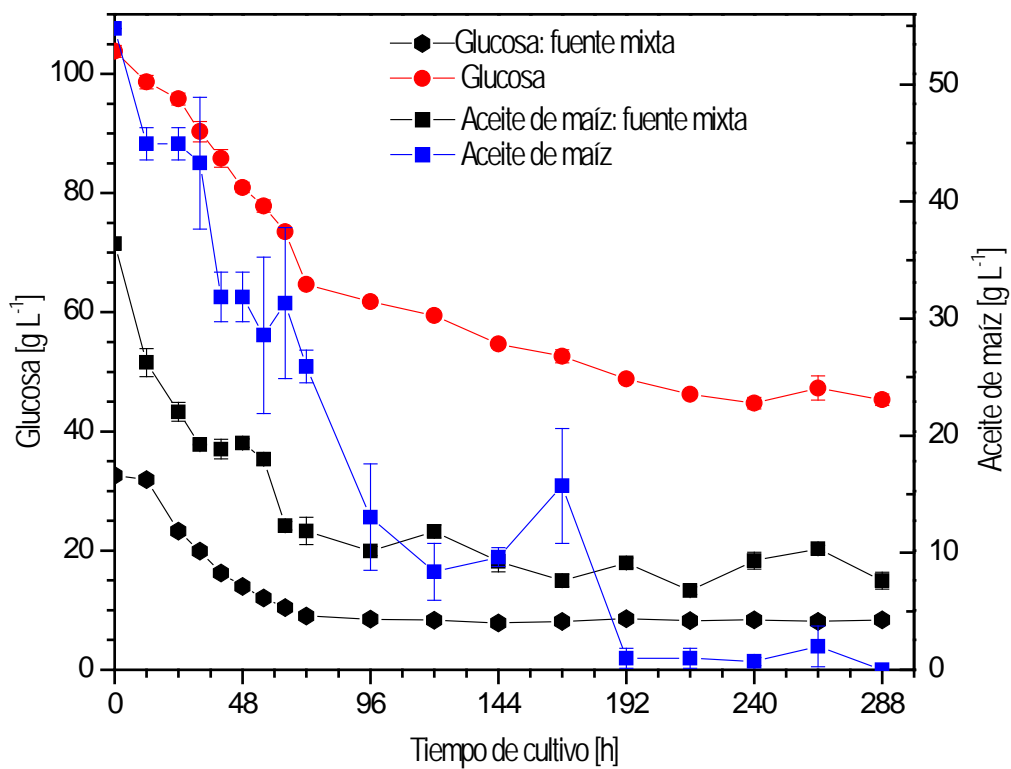


Fig 18. Cinéticas de consumo de la fuente de carbono durante la producción de ácido giberélico por *Gibberella fujikuroi*.

deflectores favorecen el mezclado y además el suministro de oxígeno.

El medio de cultivo donde se utilizó la fuente mixta, la cinética de consumo de las fuentes de carbono muestra al término de la fase exponencial hubo un consumo del 57 % de glucosa y del 47 % de aceite. Tomando como referencia la concentración inicial de ambas fuentes de carbono, durante la fase estacionaria se consumió el 17 % de glucosa y el 32 % de aceite de maíz. Al final del cultivo se consumió aproximadamente el 74 % de la glucosa y el 79 % de aceite, quedando una concentración residual de 8.4 y 7.6 g L⁻¹, respectivamente (**Fig 15 y 18**). La glucosa y el aceite de maíz se consumieron simultáneamente durante el cultivo con fuente de carbono mixta, similar a lo reportado por Rios-Irbe y col. (2011; 2013) y Martínez-Torres (2014) en cultivo microbiano con glucosa-aceite de maíz para producción de ácido giberélico por *G. fujikuroi*.

Peacock y col. (2003) explicaron que el consumo de ácidos grasos es estimulado por la presencia de glucosa, lo cual es similar a los resultados experimentales de esta investigación.

Harder y Dijkhuizen (1982) reportan que el comportamiento más común que se observa cuando se utilizan fuentes de carbono mixtas es el crecimiento diaúxico. En este tipo de crecimiento microbiano se observa una curva de crecimiento bifásica debido a la utilización secuencial de distintas fuentes de carbono. El metabolismo del microorganismo es selectivo para uno de los sustratos (se usa la fuente de carbono que permite un crecimiento más rápido) y cuando la agota, comienza a metabolizar el otro. También reportaron que cuando el uso de dos sustratos no interfieren con la utilización de uno al otro (incluso la combinación puede estimular el crecimiento), en cuyo caso los dos sustratos se metabolizan de forma simultánea. Nuestros resultados muestran que al utilizar fuente de carbono mixta, el hongo *G. fujikuroi* fue capaz de metabolizar ambos sustratos de manera simultánea bajo las condiciones de estudio. Rios-Irbe y col. (2011) concluye que los resultados de sus experimentos mostraron claramente que ambas fuentes de carbono (glucosa-aceite de maíz) se metabolizan rápidamente, lo que significa que la glucosa no ejerce la represión catabólica en la asimilación del aceite de maíz, o algún tipo de control metabólico en el transporte de ácidos grasos en las células de *G. fujikuroi*.

Harder y Dijkhuizen (1982) también explicaron que el comportamiento en el consumo de los sustratos mixtos depende generalmente de su concentración. Cuando los sustratos están presentes en concentración alta (que no limitan el crecimiento) la utilización secuencial y crecimiento diaúxico es a menudo observado y el sustrato que soporta la mayor tasa de crecimiento se utiliza preferentemente. Cuando las concentraciones del sustrato están limitando el crecimiento, la utilización simultánea de los diversos compuestos presentes en la mezcla parece ser el comportamiento más común. Estos investigadores discuten que existen por lo menos tres mecanismos de regulación en los que la utilización de un determinado sustrato a partir de una mezcla puede ser controlada, (1) regulación del consumo del medio dentro de la célula, (2) regulación de la síntesis de enzimas pertinentes, y (3) regulación de las actividades de esas enzimas.

C. CINÉTICA DE CONSUMO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO

La concentración inicial de este nutriente en el medio de cultivo es uno de los factores determinantes en la producción de giberelinas en específico del GA₃ (Kumar y Lonsane, 1989; Brückner y Blechschmidt, 1991a). La importancia de este nutriente está en que es el principal componente de proteínas y ácidos nucleicos.

La cinética de consumo de nitrógeno del cultivo usando solo glucosa como fuente de carbono mostró que el mayor consumo se dio en las primeras 32 h de cultivo (**Fig 12 y 19**), se puede observar que el periodo de las 0-12 h fue el lapso en el cual se consumió la menor concentración de nitrógeno, aproximadamente el 13 %, seguido del periodo de mayor consumo comprendido de las 12-24 h en el cual se consumió aproximadamente el 53 % de nitrógeno, y finalmente el periodo de las 24-32 h durante el cual se consumió aproximadamente el 34 % de la concentración total de nitrógeno. Después de este periodo el nitrógeno no fue detectado en el medio de cultivo. En contraste, el medio usando solo aceite de maíz como fuente de carbono, *G. fujikuroi* consumió solamente el 45 % de la concentración inicial de la fuente de nitrógeno. Al igual como se muestra en la cinética de crecimiento de biomasa de este medio de cultivo (**Fig 14 y 17**), la cinética de consumo de nitrógeno presenta dos fases de consumo, esto puede estar asociado al error experimental ya que en esta

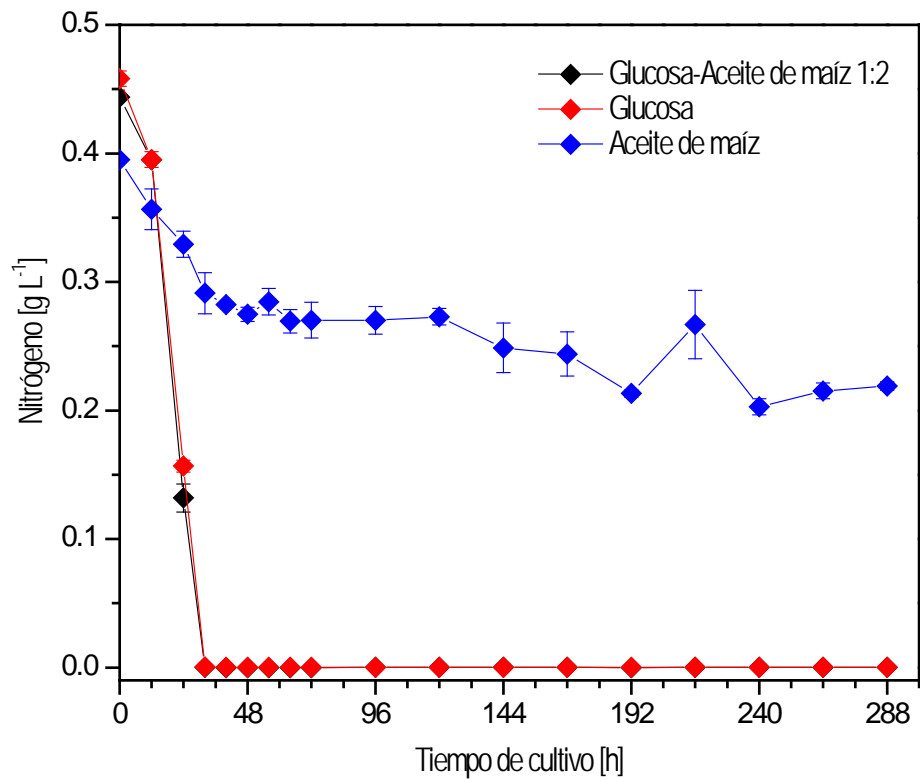


Fig 19. Cinéticas de consumo de la fuente de nitrógeno utilizando diferentes fuentes de carbono durante la producción de ácido giberélico por *Gibberella fujikuroi*.

cinética se observa mucha variabilidad en los datos a diferencia de la cinética de crecimiento. El nitrógeno no se agotó durante el cultivo microbiano quedando una concentración residual de 0.2 g L^{-1} (50% de la concentración total) (**Fig 14 y 19**). Martínez-Torres (2014) encontró que al utilizar 2 g L^{-1} de NH_4Cl , el máximo consumo de nitrógeno se realiza durante las primeras 48 h de cultivo y que este sustrato no se agota de medio de cultivo, registrándose una concentración residual en el medio de cultivo de aproximadamente 0.08 g L^{-1} durante el resto del cultivo pero esto no afectó que el microorganismo sintetizará GA_3 .

En la cinética de consumo de nitrógeno del cultivo basado en la fuente mixta glucosa-aceite de maíz en proporción 1:2 se puede observar que el contenido total del sustrato del medio de cultivo es consumido totalmente durante el intervalo de 0-32 horas. Haciendo un análisis más detallado de este periodo se observó que en el periodo 0-12 h se consume solamente el 11 % del contenido total de N, y en el periodo de 12-24 h se consume la mayor cantidad del sustrato (59 % del contenido total de N) y del periodo 24-32 h se consume el resto del nitrógeno (30% del contenido total N) agotándose del medio de cultivo (**Fig 16 y 19**).

Al comparar las cinéticas de consumo de nitrógeno se observa la misma tendencia de consumo utilizando el medio de glucosa y fuente mixta (glucosa-aceite de maíz) en ambas la fuente de nitrógeno se agota del medio de cultivo en el mismo periodo (24-32 h), resultados similares a los reportados por Martínez-Torres (2014) y Ramos-Lozano (2015) al realizar cultivos con *G. fujikuroi* empleando fuente mixta glucosa-aceite de maíz y glucosa-glicerol, respectivamente. El análisis detallado de consumo del periodo 0-32 h muestra que coincide con la tendencia de consumo de ambos cultivos, aunque al utilizar fuente mixta este fue 6 % mayor que cuando se utilizó solo glucosa en el periodo de mayor consumo (12-24 h) y en ese lapso de tiempo la biomasa producida aumento más del doble lo que concuerda con el aumento en el consumo de nitrógeno.

D. CINÉTICA DE CONSUMO DE LA FUENTE DE FOSFATOS

El fósforo es el tercer nutriente con mayor importancia en el cultivo microbiano, es indispensable que esté presente durante el proceso. Es utilizado en los ácidos

nucléicos y en los fosfolípidos y se sabe que la mayor parte de microorganismos utilizan fosfatos inorgánicos para su crecimiento (Negrete-Rodríguez, 2002).

En la cinética de consumo de fosfatos al utilizar solo glucosa se observa que el mayor consumo de este sustrato se presentó en las primeras 64 h del cultivo lo cual coincide con el término de la fase de crecimiento exponencial. A partir de las 64 h la concentración se mantuvo constante por el resto del cultivo consumiéndose solamente el 25 % de la concentración inicial de fosfatos, quedando una concentración residual de 1.7 g L^{-1} (**Fig 12 y 20**).

Cuando se empleó aceite de maíz como única fuente de carbono, hubo un menor consumo de fosfatos, siendo el periodo comprendido de las 0-72 h el de mayor consumo, después de las 72 h la concentración de este sustrato permaneció constante hasta el final del cultivo. En este medio de cultivo solamente se consumió el 12 % de la concentración de fosfatos inicial, que corresponde a una concentración residual de 2.1 g L^{-1} (**Fig 14 y 20**).

Para el cultivo basado en la fuente de carbono mixta glucosa-aceite de maíz, la cinética de consumo de fosfatos muestra que en el periodo de 0-48 h se presentó el mayor consumo, al final del cultivo se consumió el 24 % de la concentración inicial de fosfatos quedando una concentración residual de 1.7 g L^{-1} .

Comparando las cinéticas de consumo de fosfatos con los tres diferentes medios de cultivo probados se observó que el consumo de este sustrato fue solo durante la fase de crecimiento del microorganismo, a partir de ahí no hubo más consumo y la concentración permaneció constante por lo que el resto del tiempo de cultivo. Rios-Irribé y col. (2011) reportaron que en cultivo microbiano con *G. fujikuroi* el consumo de fosfatos está asociado con el crecimiento celular, por lo que una vez que este se detuvo el consumo de fosfatos también cesó lo que coincide con nuestros resultados.

El comportamiento de *G. fujikuroi* en cuanto al consumo de este sustrato en los medios con solo glucosa y fuente mixta fue muy similar y difieren del consumo en el medio donde se utilizó solamente aceite de maíz ya que en este medio fue mucho menor que en los otros medios lo que coincide con el hecho de que fue el medio donde se registró la menor cantidad de biomasa.

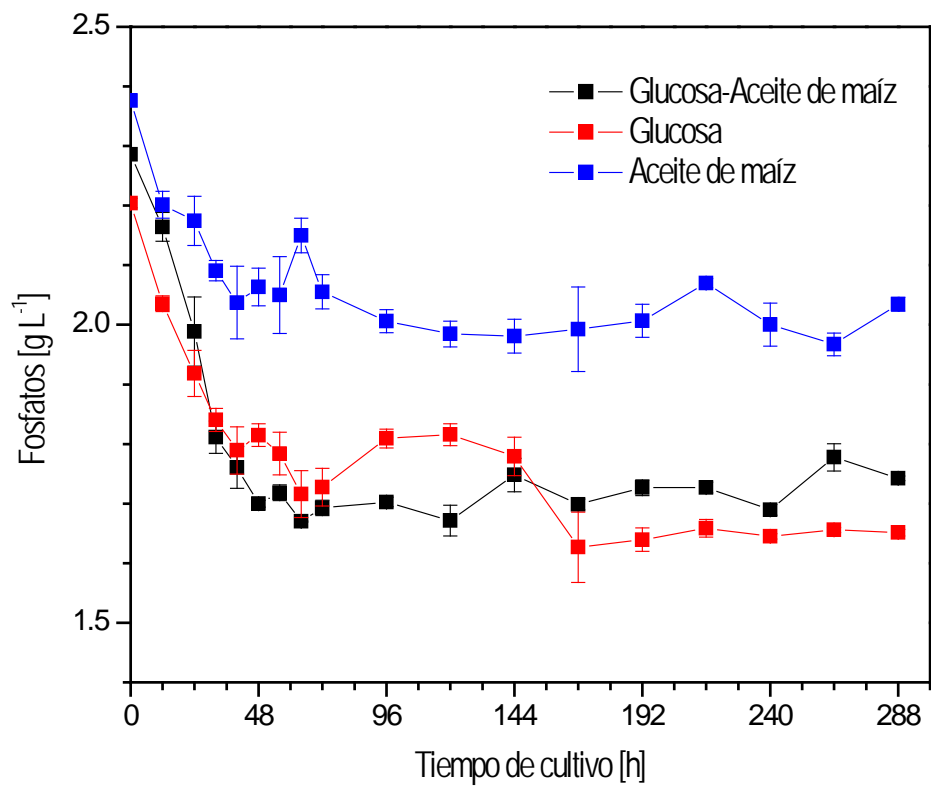


Fig 20. Cinéticas de consumo de la fuente de fosfatos utilizando diferentes fuentes de carbono durante la producción de ácido giberélico por *Gibberella fujikuroi*.

E. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO

La mayor concentración de GA₃ alcanzada en el medio con glucosa como única fuente de carbono fue de 380 mg L⁻¹ a las 144 h. La cinética de producción de GA₃ muestra presentó dos máximos de producción el primero a las 144 h y el segundo a las 240 h (**Fig 11, 12 y 21**). En el experimento se registró una alta variabilidad que podría deberse a la existencia de algún compuesto que interfiere con la determinación espectrofotométrica, y es posible que dicha interferencia cause error en la determinación.

La máxima concentración de GA₃ obtenida en el cultivo basado en aceite de maíz como única fuente de carbono fue de 750 mgL⁻¹ a las 168 h. La cinética de producción de GA₃ mostró que a partir de las 120 h la concentración de GA₃ prácticamente se mantiene constante hasta las 240 h, observándose a partir de este tiempo una disminución de la concentración hasta el final del monitoreo del bioproceso (**Fig 13, 14 y 21**). Este medio fue mejor para la producción de GA₃ que glucosa como única fuente de carbono, lo cual es similar a los resultados obtenidos por Rios-Irribé (2011). En bioprocesos es usual que la glucosa inhiba la producción de metabolitos secundarios debido a que los intermediarios generados durante su degradación pueden inhibir enzimas del metabolismo secundario (Marwick y col., 1999), los aceites vegetales al ser fuentes de carbono de lenta asimilación, no es usual que su metabolismo tenga efectos de represión sobre enzimas biosintéticas y además pueden contener precursores naturales de la biosíntesis de GAs como lo es el acetil-CoA (Vass y Jefferys, 1979; Tudzynski, 1999) lo que puede incrementar su producción .

El hongo *G. fujikuroi* además de sintetizar GAs también produce carotenoides y un policétido, bikaverina, que también surgen a través de la ruta del ácido mevalónico (**Fig 5**). Estos componentes, no obstante, raramente exceden el 0.1 % de la biomasa celular y por lo tanto no constituyen un drenaje importante de acetil-CoA lejos de otros metabolitos secundarios como lo son el GA₃ y lípidos (Jacklin y col., 2000). Estos dos últimos mecanismos metabólicos al tener el acetil-CoA como precursor común, compiten entre sí por este. Por lo cual Jacklin y col. (2000) proponen que la desviación de acetil-CoA hacia la síntesis de GAs es por lo tanto factible

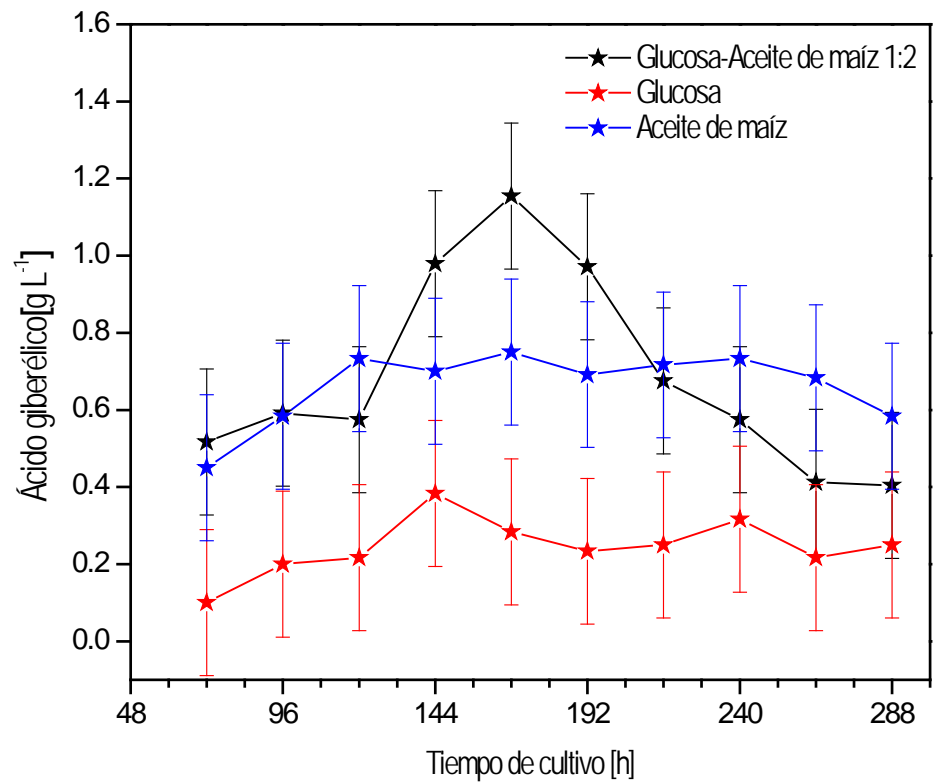


Fig 21. Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de ácido giberélico [Barras corresponden al HSD (0.37856, $\alpha=0.05$) para comparación de medias correspondientes a las fuentes de carbono].

simplemente inhibiendo la biosíntesis de ácidos grasos, tal como lo reportaron Rios-Irribé y col. (2013) cuando utilizaron una fuente de carbono mixta, quienes conjeturaron que no existe competencia entre los sustratos debido a que los ácidos grasos son suplementados al utilizar aceite como fuente de carbono.

Para el cultivo basado en una fuente mixta de carbono glucosa-aceite de maíz se obtuvo una producción máxima de 1154 mg L^{-1} de GA_3 a las 168 h. A partir de ese tiempo la concentración disminuye gradualmente (**Fig 15, 16 y 21**).

Es común observar la disminución de GA_3 en el cultivo microbiano en la etapa final del bioproceso en cultivo sumergido usando diferentes sustratos y biorreactores. Este fenómeno puede ser debido a la descomposición de GA_3 en el sistema de producción (Machado y col., 2004)

Con las tres fuentes de carbono probadas se obtuvo producción de GA_3 , a partir de las 72 horas pero difieren en el periodo de máxima producción. A pesar de que en el medio basado en aceite se obtuvo una quinta parte de biomasa con respecto al medio basado en glucosa, con aceite se obtuvo una producción de GA_3 dos veces mayor que con solo glucosa. La producción de metabolitos secundarios no siempre está relacionado con un alto crecimiento microbiano, pero si se debe proporcionar al microorganismo los nutrientes adecuados para que este se desarrolle adecuadamente y produzca el metabolito de interés (Negrete-Rodríguez, 2002; Rios-Irribé y col., 2011; 2013; Martínez-Torres, 2014).

El uso de fuentes de carbono mixtas produce 1.5 veces más ácido giberélico que el aceite de maíz (1154 contra 750 mg L^{-1}) y 3 veces más que solo glucosa (1154 contra 383 mg L^{-1}) bajo estas condiciones de estudio, lo que indica que la producción de GA_3 depende de la fuente de carbono y que coincide con los resultados reportados por Peacock y col. (2003) en la producción de actinorrodina en matraz agitado y a gran escala, así también con lo reportado por Rios-Irribé y col. (2013) en la producción de GA_3 en un biorreactor de tanque agitado. El aumento de la producción de GA_3 durante el cultivo empleando fuente de carbono mixta podría atribuirse a varios factores; algunos reportes sugieren que los extractos de harina y aceite de plantas podrían contener precursores o inductores de la vía GA (Vass y Jefferys, 1979; Rademacher, 1994). También podría atribuirse a que la solubilidad de

oxígeno en ellos es mayor con respecto a la del agua, y por tal razón contribuyen a que se incremente la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (Tudzynski, 1999; Shukla y col., 2003).

Giordano y Domenech (1999) reportaron que el nivel de aireación afecta el metabolismo secundario del acetato derivado de *G. fujikuroi* de diferentes maneras. Baja aireación pone en peligro el consumo de acetato a través del ciclo del ácido cítrico. Como consecuencia, más acetato debe estar disponible para la síntesis de derivados de acetato, tal como terpenoides y policétidos. Este fue el caso de la biosíntesis de ácidos grasos y fusarina C. La acumulación de ácidos grasos se incrementa en condiciones de baja aireación y por tanto sugiere que, *G. fujikuroi* puede contener dos sintasas de ácidos grasos funcionalmente distintas, una requerido para el metabolismo del ácido graso primario y otro para el metabolismo secundario como se muestra en *Aspergillus nidulans* (Brown y col., 1996). Ambas enzimas podrían ser regulados por el oxígeno de una manera opuesta, como ocurre en el caso de las dos enzimas hidroximetilglutaril-CoA reductasa en *Saccharomyces cerevisiae* (Hampton y col., 1996).

En los experimentos de Jacklin y col. (2000) se explica que el sesamol ejerce su efecto mediante la inhibición el suministro de NADPH, a través de su acción sobre la enzima málica, tanto a la ácido graso sintetasa y la ácido graso desaturasa, y concluyen que la enzima málico no debe estar involucrada en la prestación de NADPH para la hidroximetilglutaril-CoA reductasa implicada en la ruta de las giberelinas. También propone que en *F. moniliforme* la desviación de la acetil-CoA hacia giberelinas es factible simplemente al inhibir la biosíntesis de ácidos grasos. En su investigación la desviación de acetil-CoA a GA₃ no fue total, solamente el 25 % de las acetil-CoA no utilizada fue aparentemente usada para aumentar la síntesis de GAs, por lo que otros pasos regulatorios podrían participar en la recanalización de la acetil-CoA en otros metabolitos desconocidos (pero no bikaverina ni carotenoides) o disminuyendo el flujo de carbono total de la glucosa en depósitos de acetil-CoA.

En los experimentos realizados por Peacock y col. (2003) cuando la trioleína era el único sustrato, las tasas de β -oxidación fueron máximas y no había evidencia de la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Con glucosa como única fuente de carbono, la

biosíntesis de ácido graso se llevó a cabo y no había β -oxidación. Con los sustratos mixtos, no había ni β -oxidación ni biosíntesis de ácidos grasos, lo que indica que la glucosa provee todos los intermedios hasta el nivel de acetato y que la trioleína proporcionado la mayoría de los grupos acilos grasos de cadena recta en los lípidos. Por lo tanto, las células utilizan ambos sustratos simultáneamente, evidentemente por mecanismos mutuamente excluyentes, de ese modo lograr una mayor el crecimiento y la productividad lo que explica por qué tales nutrientes mixtos son beneficiosos en fermentaciones de *Streptomyces*.

En nuestros experimentos existió una marcada diferencia en la producción de ácido giberélico y de crecimiento celular dependiendo de la fuente de carbono utilizada. Estos resultados muestran que al emplear fuente de carbono mixta la producción de ácido giberélico obtenida fue superior que cuando se utilizaron glucosa y aceite de maíz de manera independiente (como únicas fuentes de carbono) (**Fig 21**). Además la fuente mixta fue mejor para promover el crecimiento celular que cuando se cultivó al microorganismo en el medio con solo aceite de maíz.

Nuestro grupo de investigación también ha realizado cultivos con *G. fujikuroi* utilizando fuente mixta glucosa-glicerol en matraces agitados con deflectores y tapa de ventilación reportando que la concentración producida fue de 650 mgL^{-1} (Ramos-Lozano, 2015). La mezcla glucosa-aceite de maíz fue 1.77 veces superior que glucosa-glicerol para la producción de GA_3 .

A los resultados de producción de ácido giberélico obtenidos durante cada tratamiento realizado se les aplicó un análisis de varianza, utilizando el Software Minitab Version 16 (Minitab Inc., 2012). Los resultados de dicho análisis estadístico se presentan en el **Cuadro 7**. El análisis bifactorial indica que el factor fuente de carbono y el tiempo de cultivo mostraron un efecto significativo sobre la producción de GA_3 , mientras que no hubo interacción entre los factores, esto puede ser atribuido a que los valores de concentración del ácido giberélico en algunos tiempos de muestreo mostraron mucha variabilidad por lo que sería necesario utilizar un método de cuantificación más sensible que el utilizado en esta investigación, lo cual no demerita la información vertida en esta investigación pero si deja claro la importancia de generar datos con alto grado de confiabilidad y reproducibilidad.

Cuadro 7. Análisis de varianza para la producción de ácido giberélico

FACTORES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A-Fuente de carbono	3.99547	2	1.99773	53.72	0.0000
B-Tiempo de cultivo	1.15764	9	0.12863	3.46	0.002
INTERACCIONES					
AB- Fuente de carbono-Tiempo de cultivo	1.07214	18	0.05956	1.60	0.089
Residuo	2.23147	60	0.03719		
Total (corregido)	8.45671	89			

Además se agrupó la información y se realizó una comparación entre los tratamientos utilizando la prueba estadística de Tukey, con un nivel de confianza del 95 %. Los tratamientos aceite de maíz y fuente mixta no mostraron diferencia estadística entre ellos pero si fueron diferentes del tratamiento usando solo glucosa como fuente de carbono. El análisis estadístico señala que la producción máxima de ácido giberélico fue a las 168 h cuando se utilizó fuente mixta de carbono; mientras que para el aceite de maíz se encontraron máximos a las 120 h, 168 h y 240 h, lo cual apoya la tendencia observada experimentalmente donde se mantiene estable la producción del ácido giberélico durante casi todo el tiempo del bioproceso bajo esta condición de estudio. El cultivo usando solo glucosa el mejor tiempo fue a las 144 h.

Estos resultados, bajo estas condiciones de estudio, y con el interés de transferir el conocimiento científico generado a procesos industriales, establecen el tiempo máximo que debe durar el bioproceso para posteriormente seguir con las etapas de recuperación y purificación del metabolito de interés industrial, que en este caso de investigación depende de la fuente de carbono utilizada, haciendo evidente que el uso de fuente de carbono glucosa-aceite de maíz es una estrategia exitosa desde el punto de vista productivo.

F. ANÁLISIS CINÉTICO

Para todos los tratamientos experimentales, se observó que las cinéticas de producción de biomasa obedecen un comportamiento logístico (Rios-Irribé y col., 2013) dado por la siguiente expresión:

$$\frac{dX}{dt} = k_x X \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad \text{con} \quad X(0) = X_0 \quad (1)$$

donde los parámetros del modelo son:

X_{\max} = concentración de biomasa máxima alcanzada en la fase estacionaria del cultivo

X_0 = concentración inicial de biomasa

k_x = constante cinética de crecimiento de biomasa

En el **Cuadro 8** se presentan los valores de los parámetros de ajuste obtenidos

Cuadro 8. Parámetros de ajuste del modelo logístico para la cinética de producción de biomasa de todos los tratamientos.

Tratamiento	X_0 (g L ⁻¹)	X_{max} (g L ⁻¹)	k_x (h ⁻¹)	r^2
Glucosa	0.15	15.11	0.19043	0.9373
Fuente mixta	0.21	7.77	0.2093	0.8244
Aceite de maíz	0.23	2.90	0.0744	0.8648

para las cinéticas de crecimiento de biomasa utilizando la Ec. (1), los cuales fueron determinados mediante la minimización de la suma de los errores al cuadrado mediante un código desarrollado en Matlab, el cual consistió en una técnica de integración basada en Runge-Kutta-Fehlberg (Mathews y Fink, 2004) en conjunto con la técnica de optimización del método de la métrica variable Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (Rao, 2009).

En las **Fig 22, 23 y 24** se presentan una comparación entre los datos experimentales y números de la cinética de crecimiento, y puede indicarse que existe un buen ajuste entre el modelo propuesto y los datos experimentales obtenidos. Para los experimentos que utilizaron glucosa y una fuente de mixta de glucosa-aceite de maíz se observa que la fase estacionaria fue alcanzada a las 48 h de cultivo, en cuanto al experimento que utilizó aceite como fuente de carbono, esto ocurrió aproximadamente a las 72 h. Además el modelo predice que la producción máxima de concentración de biomasa fue de 15.11, 7.77 y 2.90 g L⁻¹ para los experimentos que utilizaron glucosa, glucosa-aceite de maíz y aceite de maíz como fuente de carbono, respectivamente. La constante cinética de crecimiento de biomasa fue similar para los experimentos basados en la glucosa y glucosa-aceite de maíz como fuente de carbono, a diferencia del otro experimento (aceite de maíz como fuente de carbono) cuyo crecimiento de biomasa fue más lento, aproximadamente una tercera parte de los dos anteriores; lo cual se refleja en la baja concentración de biomasa alcanza en el mismo periodo de tiempo, y asimismo el lento metabolismo del *G. fukijuroi*.

Un variante del modelo logístico fue utilizado para modelar el consumo de los sustratos basados en la fuente de carbono. Para esto la concentración de biomasa de la Ec. (1) fue sustituido el consumo alcanzado de sustrato, el cual está dado por $S_0 - S$, obteniéndose la siguiente expresión:

$$-\frac{dS}{dt} = k_s (S_0 - S) \left(1 - \frac{S_0 - S}{S_0 - S_\infty} \right) \quad \text{con} \quad S(0) = S_0 \quad (2)$$

donde los parámetros del modelo son:

S_∞ = concentración de sustrato residual alcanzada en la fase estacionaria del cultivo

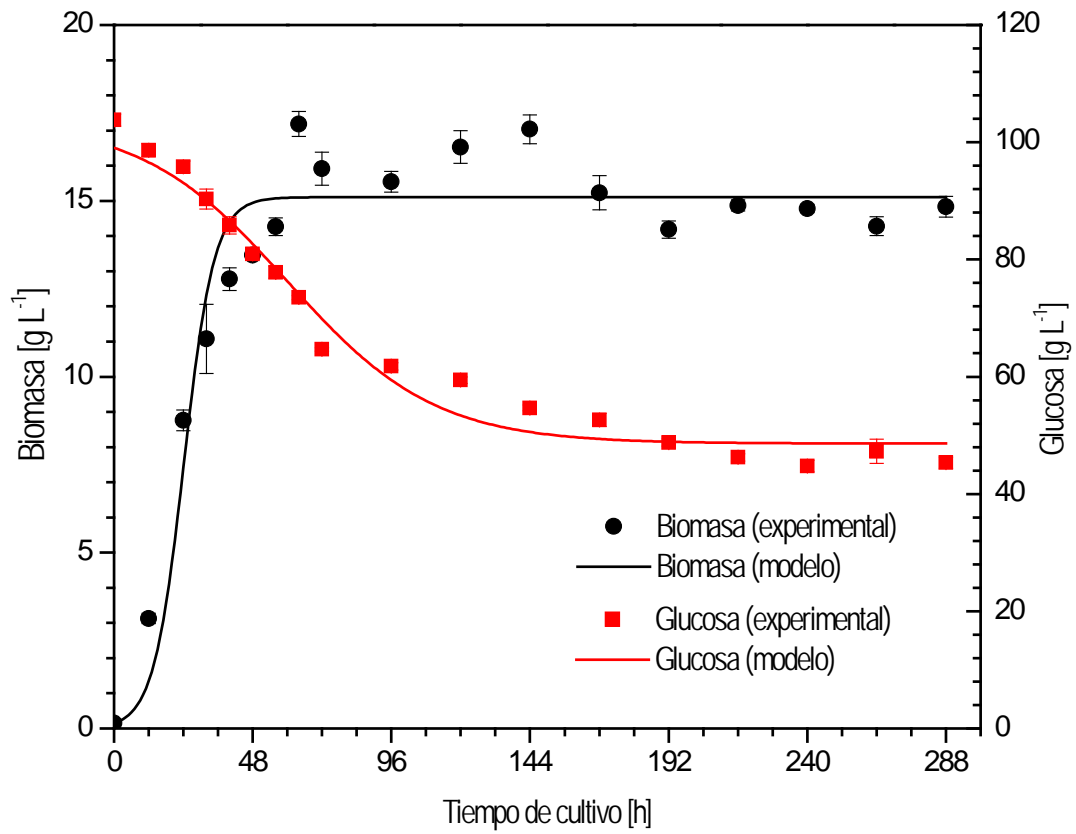


Fig 22. Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de sustrato usando glucosa como fuente carbono.

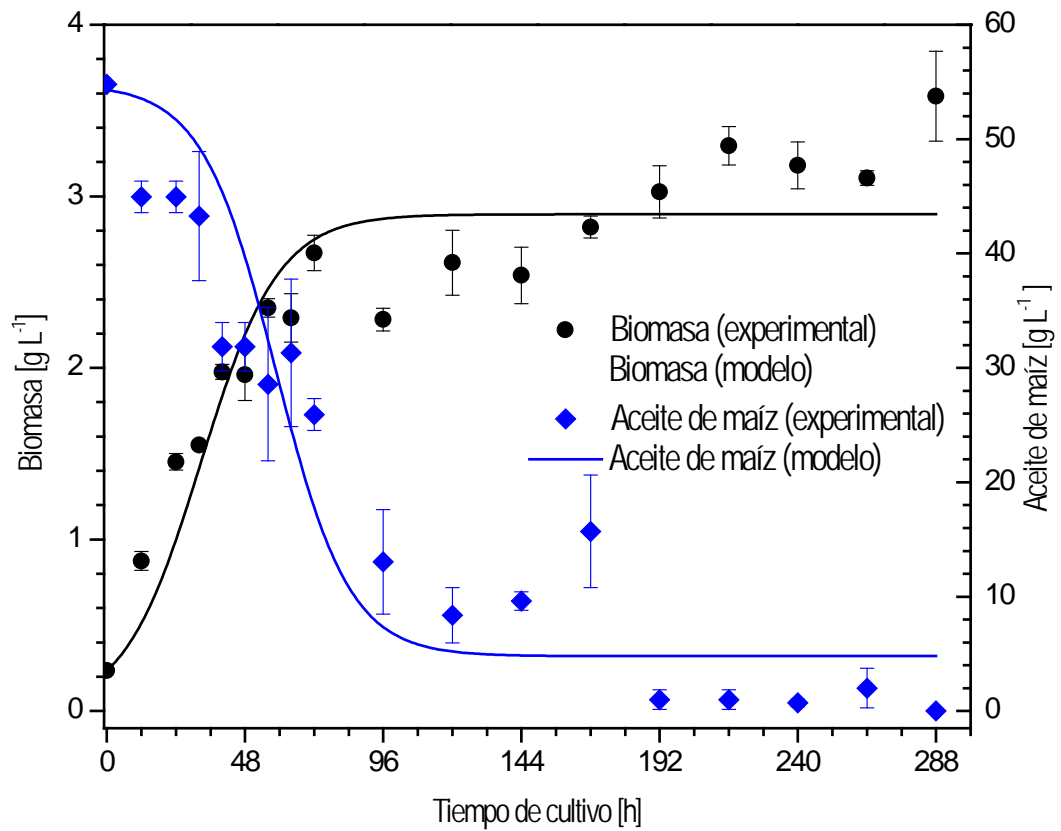


Fig 23. Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de sustrato usando aceite de maíz como fuente carbono.

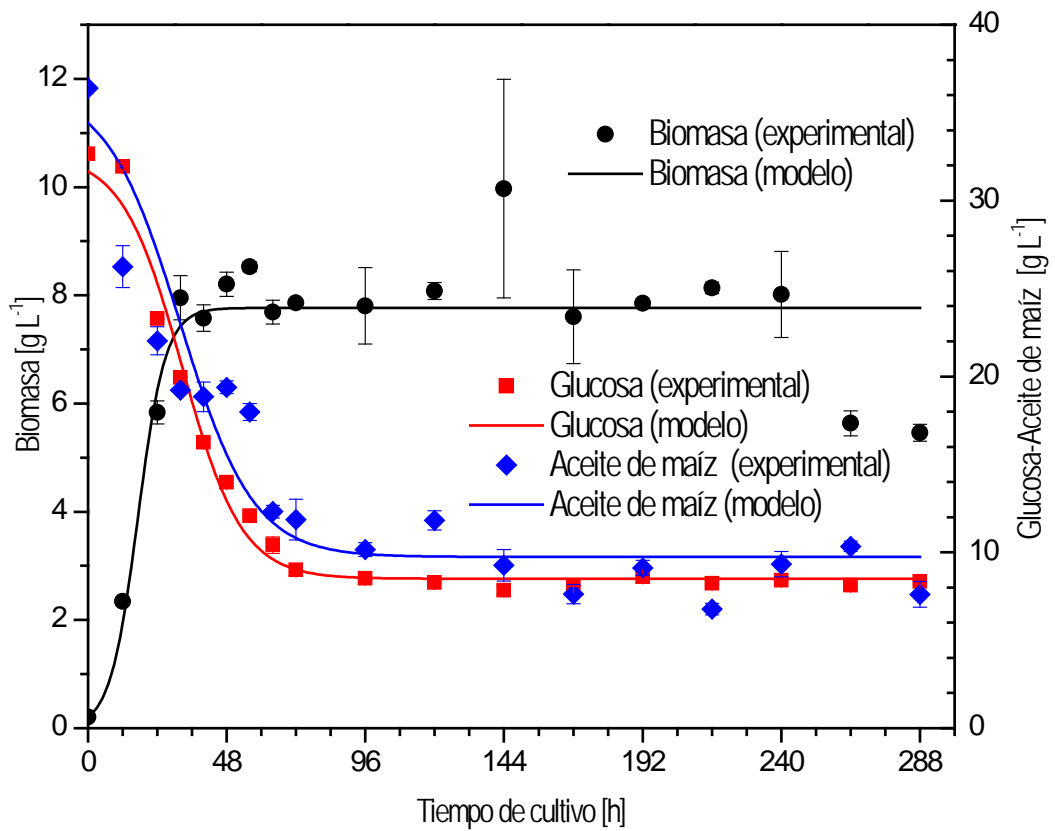


Fig 24. Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de sustratos usando fuente mixta de carbono glucosa-aceite de maíz.

S_0 = concentración inicial de sustrato

k_s = constante cinética de consumo de sustrato

Se realizó la optimización de los parámetros de ajuste de la Ec. (2) para las cinéticas de consumo de sustratos basados en carbono para cada tratamiento experimental, y los resultados obtenidos se reportan en el **Cuadro 9**. Puede observarse que existe un buen grado de correlación entre los datos experimentales y los datos numéricos, siendo el mejor ajuste el obtenido para la cinética de consumo de glucosa tanto como fuente única como mixta.

En las **Fig 22, 23 y 24** se presentan una comparación entre los datos experimentales y numéricos de todas las cinéticas de consumo de sustratos basados en carbono, y se observa que el modelo logístico representa apropiadamente el comportamiento dinámico de consumo de la fuente de carbono.

Considerando el apropiado ajuste obtenido para las cinéticas de producción de biomasa, a continuación se presentan una simulación del comportamiento del crecimiento específico de biomasa, la cual está definido mediante:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

En las **Fig 25, 26 y 27**, puede observarse que el crecimiento específico es máximo al inicio del cultivo, y disminuye con el tiempo hasta ser cero un lapso de tiempo de 48 h para los experimentos basados en glucosa y glucosa-aceite como fuente de carbono, y aproximadamente 72 h para el experimento basado en aceite como fuente de carbono. Puede inferirse que el metabolismo de *G. fujikuroi* es mucho más lento y aletargado cuando es utilizado aceite de maíz, pero similar entre sí cuando es utilizado glucosa y glucosa-aceite de maíz.

Con el propósito de establecer el efecto de la fuente de carbono, fue determinado numéricamente el consumo específico de los sustratos de carbono, el cual está definido por:

$$q_s = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt}$$

En las **Fig 25, 26 y 27** se presentan el comportamiento del consumo específico de las fuentes de carbono, y se observa que los tratamientos que utilizan glucosa y

Cuadro 9. Parámetros de ajuste del modelo logístico para la cinética de consumo de sustratos utilizando diferente fuente de carbono.

Tratamiento		S_0 (g L ⁻¹)	S_∞ (g L ⁻¹)	k_s (h ⁻¹)	r^2
Glucosa		99.04	48.60	0.0393	0.9768
Fuente mixta	Glucosa	31.65	8.50	0.0966	0.9872
	Aceite de maíz	34.40	9.74	0.0789	0.8855
Aceite de maíz		54.30	5.99	0.0796	0.8968

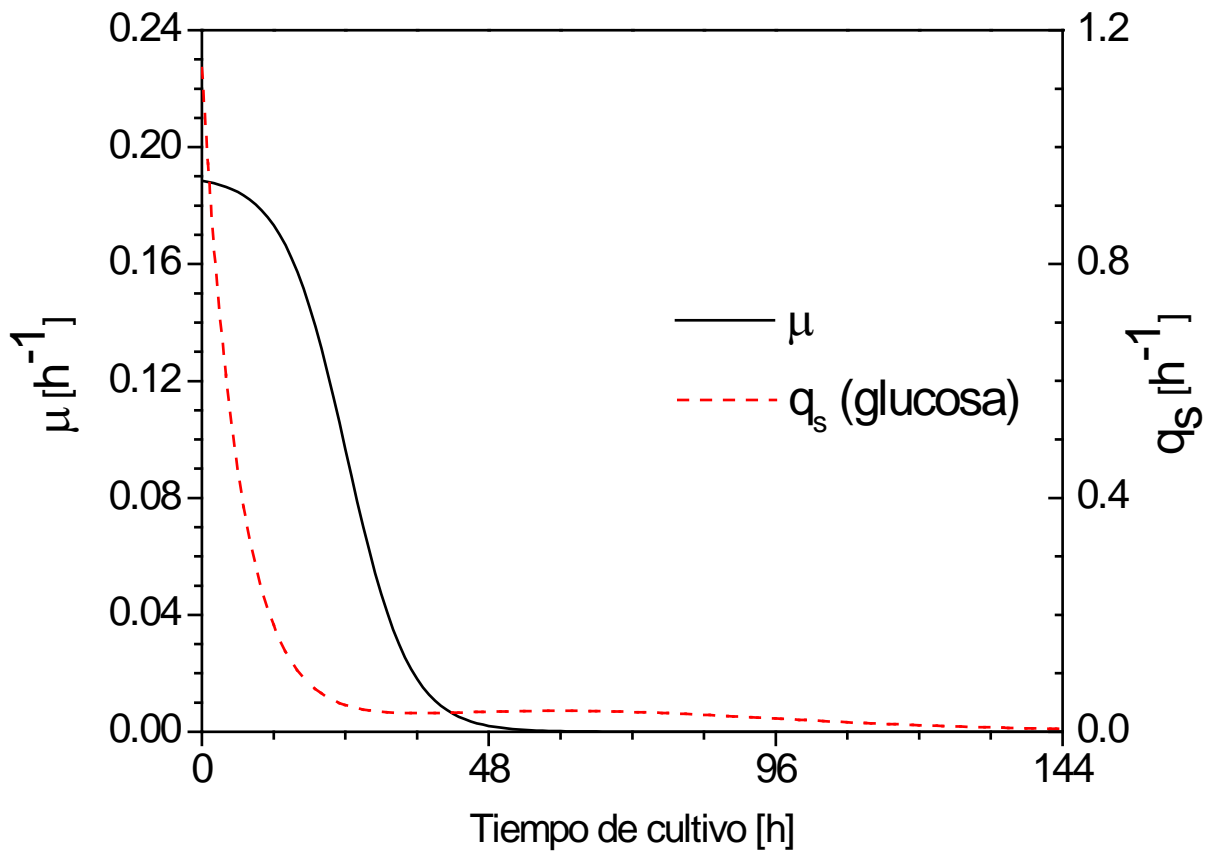


Fig 25. Simulación del crecimiento específico de biomasa y del consumo específico de sustratos para el tratamiento usando glucosa como fuente de carbono.

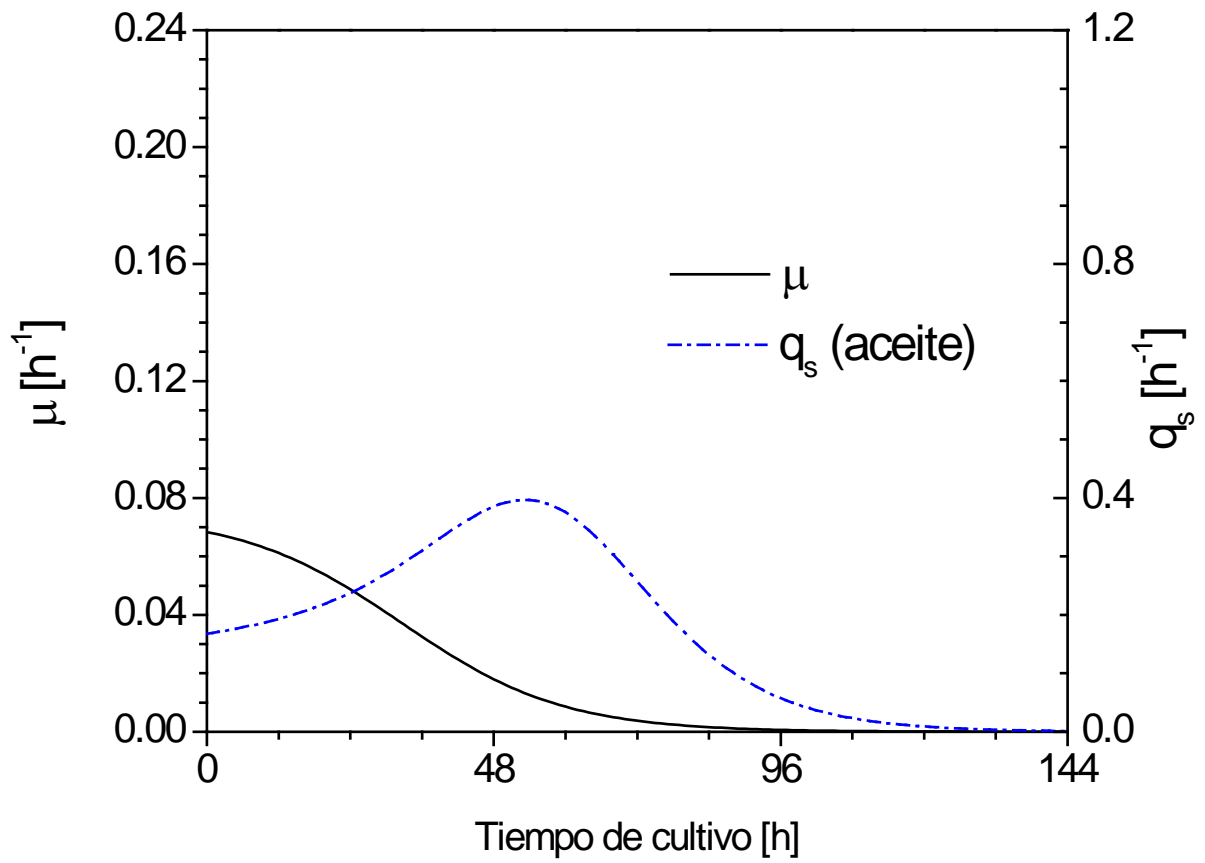


Fig 26. Simulación del crecimiento específico de biomasa y del consumo específico de sustratos para el tratamiento usando aceite de maíz como fuente de carbono.

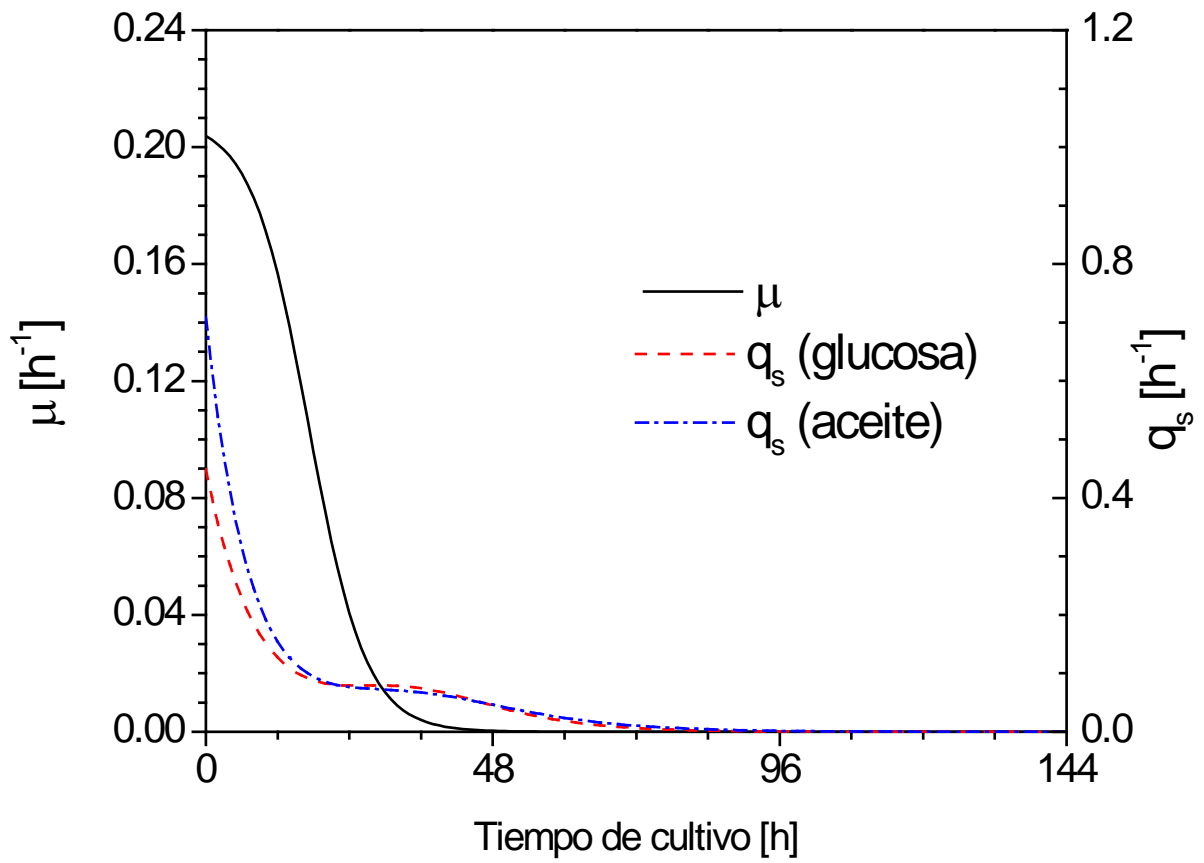


Fig 27. Simulación del crecimiento específico de biomasa y del consumo específico de sustratos para el tratamiento usando fuente mixta de carbono glucosa-aceite de maíz.

glucosa-aceite de maíz como fuente de carbono presentan una dinámica prácticamente monotónica, es decir, el consumo específico de sustrato inicia con un valor máximo y disminuye hasta cero. Más aún, para el primer tratamiento (medio basado en glucosa), la mayor variación del consumo específico se da en un lapso de 24 h, mientras que para el segundo tratamiento (medio basado en la fuente mixta), dicho lapso de tiempo requiere de 48 h aproximadamente. Al comparar los consumos específicos de glucosa y aceite en el experimento con la fuente mixta de carbono, se observó un comportamiento muy similar entre sí. La tendencia monotónica de los consumos específicos de sustratos indican la habilidad *G. fujikuroi* de asimilar dichos nutrientes desde el inicio del cultivo. Respecto al tercer tratamiento, se observa que el consumo específico de aceite de maíz presenta un máximo local a las 60 h, y además es bajo y extendido por un periodo de tiempo de 120 h aproximadamente. El aceite es una fuente de carbono que requiere la participación de enzimas como son las lipasas y esterasas, las cuales son excretadas de las células del microorganismo al medio de cultivo, previo una expresión genética regulada por la existencia de triglicéridos. En este sentido, el bajo valor del consumo específico de aceite, es debido a la posible existencia de una fase de producción las enzimas lipolíticas requeridas, la cual se genera con una baja rapidez comparada con la escala de tiempo de cultivo.

IX CONCLUSIONES

1. La fuente de carbono afectó el crecimiento de *G. fujikuroi*, así como la concentración de biomasa máxima alcanzada y la duración de la fase de crecimiento exponencial.
2. La fuente de carbono afectó el tiempo y máxima producción de GA₃ durante el cultivo con *G. fujikuroi*.
3. Cuando se utilizó fuente mixta de carbono glucosa-aceite de maíz ambos sustratos fueron consumidos simultáneamente.
4. La producción de ácido giberélico no mostró diferencia significativa al utilizar fuente de carbono mixta y aceite de maíz pero si con respecto al utilizar glucosa.
5. Los fosfatos son necesarios para el crecimiento de *G. fujikuroi* pero no durante la producción de GA₃.
6. El nitrógeno se consumió rápidamente en los medios basados en glucosa y fuente mixta, pero no en aceite de maíz.
7. El uso de fuente de carbono mixta glucosa-aceite de maíz en cultivo por lotes en matraces con deflectores y tapa de ventilación es una buena alternativa para la producción de GA₃.
8. El análisis cinético indica que existe un buen ajuste entre el modelo propuesto y los datos experimentales obtenidos.
9. La constante cinética de crecimiento de biomasa fue similar para los experimentos basados en la glucosa y glucosa-aceite de maíz como fuente de carbono, y con aceite de maíz fue tres veces más lento.
10. El modelo logístico representó apropiadamente el comportamiento dinámico de crecimiento y consumo de la fuente de carbono.

X BIBLIOGRAFÍA

- Albermann S, Linnemannstöns P, Tudzynski B. 2013. Strategies for strain improvement in *Fusarium fujikuroi*: overexpression and localization of key enzymes of the isoprenoid pathway and their impact on gibberellin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97:2979–2995.
- Almanza-Rangel S. 2005. Estudio del efecto de la relación C-N provenientes de harina y aceite de arroz sobre la producción de GA₃. Tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato, México.
- Aparecida-Takahashi J, Campos A, Pinto A, Corrêa D. 2013. Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi. *Phytochemistry Reviews* 12:773-789.
- Arias de la Torre LE. 2014. Efecto del número de aplicaciones de ácido giberélico y ácido giberélico mas citocininas sobre la producción y calidad de la uva de mesa en la variedad *Emerald Seedless (Vitis vinifera L.)*. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Torreón, Coahuila, México.
- Bent KJ y Morton AG. 1963. Formation and nature of swollen hyphae in *Penicillium* and related fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 46:401–408.
- Berríos J, Illanes A y Aroca G. 2004. Spectrophotometric method for determining gibberellic acid in fermentation. *Biotechnology letters* 26:67-70
- Bianchi D, Bertrand O, Haupt K y Coello N. 2001. Effect of gluconic acid as a secondary carbon source on non-growing L-lysine producers cells of *Corynebacterium glutamicum*. Purification and properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Enzyme and Microbial Technology* 28:754–759.
- Bömke C y Tudzynski B. 2009. Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry* 70:1876–1893.
- Borrow A, Brown S, Jefferys EG, Kessel RHJ, Lloyd EC, Lloyd PB, Rothwell A, Rothwell B, Swait JC. 1964. The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi*

- in stirred culture. *Canadian Journal of Microbiology* 10:407-444.
- Brown DW, Adams, TH y Keller NP. 1996. *Aspergillus* has distinct fatty acid synthases for primary and secondary metabolism. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 10:14873-14877.
- Brückner B y Blechschmidt D. 1991a. The gibberellin fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology* 11:163-192.
- Brückner B y Blechschmidt D. 1991b. Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35:646-650.
- Brückner B, Blechschmidt D y Recknagel RD. 1991. Optimization of nutrient medium for biosynthesis of gibberellic acid. *Journal Basic Microbiology* 31:243-250.
- Büchs J. 2001. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal* 7:91–98.
- Candau R, Avalos J, Cerda-Olmedo E. 1991. Gibberellins and carotenoids in the wild type and mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Applied and Environment Microbiology* 57:3378-3382.
- Cane ED. 1994. Polyketide biosynthesis: molecular recognition or genetic programming? *Science* 263:338-340.
- Chávez-Parga MC. 2005. Producción de ácido giberélico en un biorreactor airlift. Tesis de Doctorado, Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato, México.
- Chen XS, Ren XD, Dong N, Li S, Li F, Zhao FL, y Mao ZG. 2012. Culture medium containing glucose and glicerol as a mixed carbon source improves de ϵ -poli-L-lisina production by *Streptomyces* sp. M-Z18. *Bioprocess Biosystem Engineering* 35:469-475.
- Crocker SJ y Hedden P. 2000. Analysis of Gibberellins. En “Plant hormone protocols”. Tucker GA y Roberts JA (ed). Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 93-99.
- Cruz-Sancán CD. 2002. Efectos del almacenaje, la deshidratación y del ácido giberélico en la germinación del mamey sapote (*Pouteria sapota* (Jacq.) Moore y Stearn). Tesis de Licenciatura, Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras.
- Cuali-Álvarez I, Pavón-Romero S, Colín-Cruz A. 2011. Producción de ácido giberélico

- a partir de *Gibberella fujikuroi* utilizando lodo residual municipal como sustrato. *Universitas Scientiarum* 16:51-62.
- Dekker R y Barbosa A. 2001. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 28:81–88.
- Drew SW y Demain AL. 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annual Review of Microbiology* 31:343-356.
- Drew SW y Wallis AA. 1983. Regulation of secondary Metabolism and keys to its manipulation. En “Secondary Metabolism and Differentiation in Fungi”. Bennett JW y Ciegler A(Ed). Marcel Dekker, New York, United States, pp 35-55.
- Durán-Páramo E, Molina J, Marco A, Brito A, Robles MF. 2004. Gibberellic Acid Production by Free and Immobilized Cells in Different Culture Systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113-116:381-388.
- Ertola R, Mignone C y Yantorno O. 1995. Microbiología Industrial. En “Monografías del Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico”. Departamento de Asuntos Científicos y Tecnológicos de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA).
- Escamilla-Silva EM, Dendooven L, Uscanga-Reynell JA, Monroy-Ramírez AI, González-Alatorre G, De la Torre M. 1999. Morphological development and gibberellin production by different Strains of *Gibberella fujikuroi* in shake flasks and biorreactor. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15:753-755.
- Escamilla-Silva EM, Dendooven L, Magaña IP, Parra R, De la Torre M. 2000. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors. *Journal Biotechnology* 76:147-155.
- Folch J, Less M y Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226:497-509.
- Galindo E, Flores C, Larralde-Corona P, Corkidi-Blanco G, Rocha-Valadez JA, Serrano-Carreón L. 2004. Production of 6-pentyl-pyrone by *Trichoderma*

- harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks. *Biochemical Engineering Journal* 18:1–8.
- Gancheva V, Dimova T, Kamenov K, Foutekova M. 1984. Biosynthesis of gibberellins III. Optimization of nutrient medium for biosynthesis of gibberellins upon using mathematical methods for planning the experiments. *Acta Microbiologica Bulgarica* 14:80-84.
- Gelmi C, Pérez-Correa R, González M, Agosin E. 2000. Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. *Process Biochemistry* 35:1227-1233.
- Gelmi C, Pérez-correa R, Agosin E. 2002. Modelling *Gibberella fujikuroi* Growth and GA₃ production in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 37:1033-1040.
- Georgi T, Rittmann D y Wendisch VF. 2005. Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: Roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. *Metabolic Engineering* 7:291–301.
- Giordano W y Domenech CE. 1999. Aeration affects acetate destination in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiology Letters* 180:111-116.
- Giordano W, Avalos J, Cerdá-Olmedo E, Domenech CE. 1999. Nitrogen availability and production of bikaverin and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiology Letters* 173:389-393.
- Hampton R, Dimster-Denk D y Rine J. 1996. The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation. *Trends in Biochemical Sciences* 21:140-145.
- Harder W y Dijkhuizen L. 1982. Strategies of mixed substrate utilization in microorganism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B* 297:459-480.
- Harris DC. 2007. Fundamentos de espectrofotometría. En “Análisis químico cuantitativo”. Editorial Reverté, Barcelona, España, pp 407-425.
- Holbrook A, Edge W y Bailey F. 1961. Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. *Advances in Chemistry Series* 28:159-167.
- Hollmann D, Switalski J, Geipel S, Onken U. 1995. Extractive fermentation of gibberellic acid by *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Fermentation and*

- Bioengineering* 79:594-600.
- Jacklin A, Ratledge C y Wynn JP. 2000. Lipid-to-gibberellin metabolic switching in *Fusarium moniliforme* via the action of sesamol. *Biotechnology Letters* 22:1983-1986.
- Jefferys EG. 1970. The Gibberellin Fermentation. *Advances in Applied Microbiology* 13:283-316.
- Jones A y Pharis RP. 1987. Production of gibberellins and bikaverin by cell of *Gibberella fujikuroi* immobilized in Carrageenan. *Fermentation Technology* 65:717-722.
- Jong-Sun Y y Hwa-Won R. 2001. Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1. *Process Biochemistry* 37:235–240.
- Juarez C y Rochín LC. 1966. Manual de Química Aplicada. Imprenta Arana, S.A.
- Karakoc S y Aksöz N. 2006. Some optimal cultural parameters for gibberellic acid biosynthesis by *Pseudomonas* sp. *Turkish Journal of Biology* 30:81-85.
- Kawanabe Y, Yamane H, Murayama T, Takahashi N, Nakamura T. 1983. Identification of gibberellin A₃ in mycelia of *Neurospora crassa*. *Agricultural and biological chemistry* 47:1693-1694.
- Kumar PKR y Lonsane BK. 1989. Microbial production of gibberellins: state of the art. *Advanced Applied Microbiology* 34:29-139.
- Lee JM. 1992. Cell kinetics and fermenter Design. En "Biochemical Engineering". Editorial Prentice Hall, United States of America, pp 1-53.
- Li C, Xia JY, Chu J, Wang YH, Zhuang YP y Zhang SL. 2013. CFD analysis of the turbulent flow in baffled shake flaks. *Biochemical Engineering Journal* 70:140-150.
- Linnemannstönns P, VoßT, Hedden P, Gaskin P, Tudzyski B. 1999. Deletions in the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi* by restriction enzyme mediated integration and conventional transformation-mediated mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2558-2564.
- Liu Y, Zhang Y, Zhang R, Zhang F, Zhu J. 2011. Glycerol/Glucose Co-Fermentation: One More Proficient Process to Produce Propionic Acid by *Propionibacterium*

- acidipropionici*. *Current Microbiology* 62:152–158.
- Lu ZX, Xie ZC y Kumakura M. 1995. Production of gibberellic acid in *Gibberella fujikuroi* adhered onto polymeric fibrous carriers. *Process Biochemistry* 30:661-665.
- Machado CMM, Oliveira BH, Pandey A, Soccol CR. 2000. Coffee husk as substrate for the production of gibberellic acid by fermentation. En “*Coffee Biotechnology and Quality*”. Sera T, Soccol CR, Pandey A y Roussos S (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dorcrecht, pp 401-408.
- Madigan MT, Martinko JM y Parker J. 2008. En “*Brock Biología de los microorganismos*”. Editorial Pearson, Southern Illinois University Carbondale, pp 38-39.
- Martínez-Torres KS. 2014. Producción de ácido giberélico utilizando fuente de carbono mixta glucosa-aceite bajo condiciones limitadas de nitrógeno. Tesis de Licenciatura, Facultad de ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.
- Marwick JD, Wright PC y Burgess JG. 1999. Bioprocess Intensification for Production of Novel Marine Bacterial Antibiotics Through Bioreactor Operation and Design. *Marine Biotechnology* 1:495-507.
- Mathews JH y Fink KD. 2004. Solution of Differential Equations. En “*Numerical Methods Using Matlab*”. Editorial Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, pp 466-474.
- Mende K, Homann V y Tudzynski B. 1997. Molecular characterization of the geranylgeranyl diphosphate synthase gene of *Gibberella fujikuroi*. *Molecular and General Genetics* 255:96–105.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31:426-428.
- Monteiro-Machado MC, Oishi BO, Ashok P, Soccol CR. 2004. Kinetics of *Gibberella fujikuroi* growth and gibberellic acid production by solid-State fermentation in a packed-bed column bioreactor. *Biotechnology Progress* 20:1449-1453.
- Monteiro-Machado CM y Soccol CR. 2007. Gibberellic Acid Production. En “*Current Developments in Solid-State Fermentation*”. Pandey A, Soccol CR y Larroche

- C (Ed). pp 277-301.
- Muromtsev GS y Agnistova VN. 1984. Gibberellins. Ed. Letunova S.V. Nauka, Moscow.
- Negrete-Rodríguez X. 2002. Producción de ácido giberélico en biorreactor de tanque agitado con *Gibberella fujikuroi* empleando aceite de maíz como fuente de carbono. Tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato, México.
- Negrete-Rodríguez X. 2007. Producción de giberelinas por *G. fujikuroi*: Efecto de las condiciones de agitación y aireación en la productividad de un cultivo tetrafásico miceliar. Tesis de doctorado, Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato, México.
- Nhujak T, Srisa AM, Kalampakorn K, Tolieng V, Petsom A. 2005. Determination of Gibberellic Acid in Fermentation Broth and Commercial Products by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1884-1889.
- Oller-López JL, Avalos J, Barrero AF, Oltra JE. 2003. Improved GA₁ production by *Fusarium fujikuroi*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63:282-285.
- Patiño VM. 1995. Establecimiento de un proceso de fermentación sumergida para la producción de ácido giberélico a nivel laboratorio y su escalamiento a planta piloto. Tesis de Maestría, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, México.
- Peacock L, Ward J, Ratledge C, Dickinson FM, Ison A. 2003. How *Streptomyces lividans* uses oils and sugars as mixed substrates. *Enzyme and Microbial technology* 32:157-166.
- Peter CP, Suzuki Y, Rachinskiy K, Lotter S, Büchs J. 2005. Volumetric power consumption in baffled shake flasks. *Chemical Engineering Science* 61:3771-3779.
- Phinney BO. 1983. The history of gibberellins. *The biochemistry and physiology of gibberellins* 1:19-52.
- Pierotty CD, Otálvaro AA, Algecira EN. 2006. Producción de ácido giberélico utilizando biocatalizadores soportados en matrices porosas. *Universitas*

- Scientiarum* 11:41-50.
- Rademacher W y Graebe JE. 1979. Gibberellin A4 produced by *Sphaceloma manihoticola*, the cause of the superelongation disease of cassava (*Manihot esculenta*). *Biochemical and biophysical research communications* 91:35-40.
- Rademacher W. 1994. Gibberellin formation in microorganisms. *Plant Growth Regulation* 15:303-314.
- Ramírez OT. 2004. Ingeniería Bioquímica. En “Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna” Bolívar-Zapata FG (Ed). El colegio nacional, México, D.F. pp 249-296
- Ramos-Lozano AS. 2015. Producción de ácido gibérelco utilizando fuente de carbono mixta glucosa-glicerol bajo condiciones limitadas de nitrógeno. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.
- Ramos-Miranda LF. 2014. Análisis morfológico del aire incorporado en Matraces agitados orbitalmente. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Rao SS. 2009. Indirect search (descent) methods. En “Engineering Optimization: Theory and Practice”. Editorial Wiley, Hoboken, New Jersey, pp 360-363.
- Raventos D, Meier C, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J. 2000. Fusion genetic analysis of gibberellin signaling mutants. *The Plant Journal* 22:427-438.
- Rios-Iribe EY. 2003. Expresión genética del hongo *Gibberella fujikuroi* bajo diferentes fuentes de carbono mediante la técnica de despliegue diferencial. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro-Instituto Tecnológico de Celaya. Santiago de Querétaro, Querétaro.
- Rios-Iribe EY. 2011. Efecto inductivo que ejerce una fuente de carbono mixta en la producción de ácido giberélico por *Gibberella fujikuroi*. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Querétaro-Instituto Tecnológico de Celaya. Santiago de Querétaro, Querétaro.
- Rios-Iribe EY, Flores-Cotera LB, González-Chávira MM, González-Alatorre G, Escamilla-Silva EM. 2011. Inductive effect produced by a mixture of carbon

- source in the production of gibberellic acid by *Gibberella fujikuroi*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:1499–1505.
- Rios-Iribe EY, Hernández-Calderón OM, Reyes-Moreno C, Contreras-Andrade I, Flores-Cotera LB, Escamilla-Silva EM. 2013. A possible mechanism of metabolic regulation in *Gibberella fujikuroi* using a mixed carbon source of glucose and corn oil inferred from analysis of the kinetics data obtained in a stirrer tank bioreactor. *Biotechnology Progress* 29:1169–1180.
- Robinson T, Singh D y Nigam P. 2001. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55:284-289.
- Rodrigues C, Porto de Souza L, de Oliveira J, Soccol CR. 2012. New perspectives of gibberellic acid production: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 32:263-273.
- Rybakov YA y Bourd GI. 1991. Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis enzyme complex in *Fusarium moniliforme*. *Journal of Biotechnology* 21:219-228.
- Sánchez-Fernández R, Avalos J y Cerdá-Olmedo E. 1997. Inhibition of gibberellin biosynthesis by nitrate in *Gibberella fujikuroi*. *FEBS Letters* 413:35-39.
- Sassa T, Kawaide H y Takarada T. 1994. Identification of gibberellins A4, A9, and A24 from *Phaeosphaeria* sp. L487 cultured in a chemically defined medium. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 58:438-439.
- Schneider J, Niermann K y Wendisch VF. 2011. Production of the amino acids L-glutamate, L-lysine, L-ornithine and L-arginine from arabinose by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* 154:191–198.
- Shukla R, Srivastava AK y Chand S. 2003. Bioprocess strategies and recovery process in gibberellic acid fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8:269-278.
- Shukla R, Chand S y Srivastava AK. 2005a. Batch kinetics and modeling of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme and Microbial Technology* 36:492-497.
- Shukla R, Chand S y Srivastava AK. 2005b. Improvement of gibberellic acid production using a model based fed-batch cultivation of *Gibberella fujikuroi*.

Process Biochemistry 40:2045-2050.

- Solórzano L. 1969. Determination of Ammonia in Natural Waters by the Phenol hypochlorite Method. *Limnology and Oceanography* 14:799-801.
- Solorza-Salas F. 1999. Mejoramiento de los parámetros para la obtención de ácido giberélico en un biorreactor mecánicamente agitado utilizando al hongo *Gibberella fujikuroi*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Guanajuato, México.
- Taiz L y Zeiger E. 2006. Giberelinas: Reguladoras de altura de las plantas. En "Fisiología vegetal". Editorial Publicacions de la Universitat Jaume I, Castellón de la plana, España, pp 881-936.
- Thomas WH y Donson AN. 1968. Effects of phosphate concentration on cell division rates and yield of a tropical oceanic diatom. *The Biological Bulletin* 134:199-208.
- Tudzynski B y Höltter K. 1998. Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal Genetics and Biology* 25:157-170.
- Tudzynski B. 1999. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52:298-310.
- Tudzynski B, Hedden P, Carrera E, Gaskin P. 2001. The P450-4 gene of *Gibberella fujikuroi* encodes ent-kaurene oxidase in the gibberellin biosynthesis pathway. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3514–3522.
- Tudzynski B, Rojas MC, Gaskin P, Hedden P. 2002. The gibberellin 20-oxidase of *Gibberella fujikuroi* is a multifunctional monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* 277:21246–21253.
- Tudzynski B, Mihlan M, Rojas MC, Linnemannstöns P, Gaskin P, Hedden P. 2003. Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi*: des and P450-3 encode GA₄ desaturase and the 13-hydroxylase, respectively. *Journal of Biological Chemistry* 278:28635–28643.
- Tudzynski B. 2005. Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66:597-611.

- Tudzynski B. 2014. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in Microbiology* 5:1-15.
- Uscanga-Reynell JA. 1992. Optimización de inóculos de *Gibberella fujikuroi* para la producción de ácido giberélico y descripción morfológica de la cepa durante el proceso de fermentación. Tesis de Licenciatura, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D.F.
- Valdovinos-García. 2014. Síntesis del proceso de obtención de ácido giberélico en un reactor de tanque agitado de mezcla completa. Tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato, México.
- Vass RC y Jefferys EG. 1979. Gibberellic acid. En "Economic microbiology". Rose AH (Ed). Academic Press London.
- Vining LC. 1992. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity—a review. *Gene* 115:135-140.
- Wang DIC, Cooney CL, Demain AL, Dunnill P, Humphrey AE, Lilly MD. 1979. Fermentation and enzyme technology. A wiley-Interscience Publication. pp 6-8.
- Wang Z y Yang ST. 2013. Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. Shermanii. *Bioresource Technology* 137:116–123.
- Wynn JP, Kendrick A y Ratledge C. 1997. Sesamol as an inhibitor of growth and lipid metabolism in *Mucor circenelloides* via its action on malic enzyme. *Lipids* 32:605-610.
- Xiea J, Yang R, Zhou Q, Du P, Gan R, Ye Q. 2013. Efficiencies of growth and angiotensin expression in cultures of *Pichia pastoris* fed with mixed carbon sources. *Chemical Biochemical Engineering Quarterly* 27:235–244.
- Yabuta T y Sumiki T. 1938. The crystallization of gibberellins A and B. *Journal of the Agricultural Chemical Society Japan* 14:1526.

XI ANEXOS

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. Determinación de glucosa

Para la determinación de glucosa se requirió la preparación de los siguientes reactivos:

- ✓ Solución madre de glucosa (1 mg mL^{-1})

Reactivo	Cantidad (g)	Fórmula química
Glucosa	0.1	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

Se disolvió la glucosa en 40 mL de agua destilada y una vez disuelta completamente se aforó a 100 mL.

- ✓ Reactivo de Miller

Reactivo	Cantidad (g)	Fórmula química
Hidróxido de sodio	10	NaOH
Fenol	2	$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$
Sulfito de sodio	0.5	Na_2SO_3
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	10	$\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$

En 400 mL de agua destilada se agregaron uno por uno los reactivos (disolver perfectamente antes de agregar el siguiente) en el orden anterior y se aforó a 1 L. Almacenar en frasco ámbar.

- ✓ Sal de Rochelle

Reactivo	Cantidad (g)	Fórmula química
Tartrato de sodio y potasio	30	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

En 40 mL de agua destilada caliente se disolvió el tartrato de sodio y potasio, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se aforó a 100 mL.

2. Determinación de nitrógeno

Para la cuantificación de nitrógeno amoniacal se prepararon los siguientes reactivos:

- ✓ Solución madre de cloruro de amonio (5 mM)

Reactivo	Cantidad (g)	Fórmula química
Cloruro de amonio	0.02675	NH ₄ Cl

Previamente se secó la sal a 90 °C por 4 horas, se colocó en el desecador por 20 min y se pesó, se disolvió en agua destilada y se aforó a 100 mL.

✓ Solución A

Reactivo	Cantidad	Fórmula química
Fenol	4 g	C ₆ H ₅ OH
Etanol absoluto	500 mL	CH ₃ CH ₂ OH

Se disolvió el fenol en 200 mL de etanol absoluto, se disolvió perfectamente y se aforó a 500 mL. Esta solución es estable a temperatura ambiente.

✓ Solución B

Reactivo	Cantidad (g)	Fórmula química
Nitroprusiato de sodio dihidratado	0.075	Na ₂ [Fe(CN) ₅ NO]O·2H ₂ O

Se disolvió el nitroprusiato de sodio en agua destilada y se aforó a 100 mL. Se almacenó en frasco ámbar. La solución es estable por 1 semana.

✓ Solución C

Reactivo	Cantidad (g)	Fórmula química
Citrato de sodio tribásico hidratado	15	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·XH ₂ O
Hidróxido de sodio	0.8	NaOH

Se disolvió perfectamente el citrato de sodio tribásico y el hidróxido de sodio en 200 mL de agua destilada y aforar a 1000 mL.

✓ Solución D

Reactivo	Cantidad (mL)	Fórmula química
Cloro comercial (Cloralex, Hipoclorito de sodio 4 %)	2	NaClO
Solución C	23	

A los 23 mL de solución C se agregan los 2 mL de cloro. Esta solución de debe preparar antes de ser usada. Es estable aproximadamente por 1 h.

3. Determinación de fosfatos

Para la determinación de fosfatos prepararon los siguientes reactivos:

- ✓ Solución madre de fosfatos (500 mg L⁻¹)

Reactivo	Cantidad (g)	Fórmula química
Fosfato de potasio monobásico	0.07165	KH ₂ PO ₄

Se disolvió la sal en 40 mL de agua destilada y se aforó a 100 mL.

- ✓ Solución de ácido concentrado de molibdato de amonio

Reactivo	Cantidad	Fórmula química
Molibdato de amonio	15.7 g	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O
Ácido sulfúrico concentrado	126 mL	H ₂ SO ₄
Ácido nítrico concentrado	1.7 mL	HNO ₃

En 200 mL de agua destilada se adicionó lentamente el ácido sulfúrico con la ayuda de un agitador de vidrio (dejar resbalar por las paredes del matraz). Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Posteriormente se le agrego el ácido nítrico concentrado. El molibdato de amonio se disolvió en 100 mL de agua destilada y por último se le agregó esta solución a la solución preparada anteriormente y se aforó a 500 mL. Se almacena en frasco ámbar.

- ✓ Solución de ácido amino-naftol-sulfónico

Reactivo	Cantidad (g)	Fórmula química
Ácido amino-naftol-sulfónico	0.75	NH ₂ C ₁₀ H ₅ OH·SO ₃ H
Sulfito de sodio anhidro	42	Na ₂ SO ₃
Metabisulfito de sodio anhidro	70	Na ₂ S ₂ O ₅

Se disolvió el sulfito de sodio y el metabisulfito en 400 mL de agua destilada. Posteriormente el ácido amino-naftol-sulfónico finamente triturado se agrega y se

disuelve para finalmente aforar a 1 L. La solución debe ser conservada en frasco ámbar con tapón esmerilado a una temperatura no mayor de 30 °C y es estable por 4 meses.

4. Determinación de GA₃

Para la determinación de GA₃ se prepararon los siguientes reactivos:

- ✓ Solución madre de GA₃ (1000 mg L⁻¹)

Reactivo	Cantidad (g)	Fórmula química
Ácido giberélico (GA₃)	0.05	C ₁₉ H ₂₂ O ₆

Se disolvió el ácido giberélico en agua destilada y se aforó en 50 mL.

- ✓ Solución de HCl 3.75 M

Reactivo	Cantidad (mL)	Fórmula química
Ácido clorhídrico (pureza del 37.1 y densidad de 1.19 g m L⁻¹)	155	HCl

En 250 mL agua destilada se agregó el HCl lentamente y aforó a 500 mL.

CURVAS DE CALIBRACIÓN

Curva de calibración de glucosa

Cuadro 10. Curva de calibración para la determinación de glucosa

mg mL^{-1}	A_{575}
0.1	0.038
0.2	0.161
0.4	0.377
0.5	0.49
0.6	0.605
0.8	0.818
1	1.044

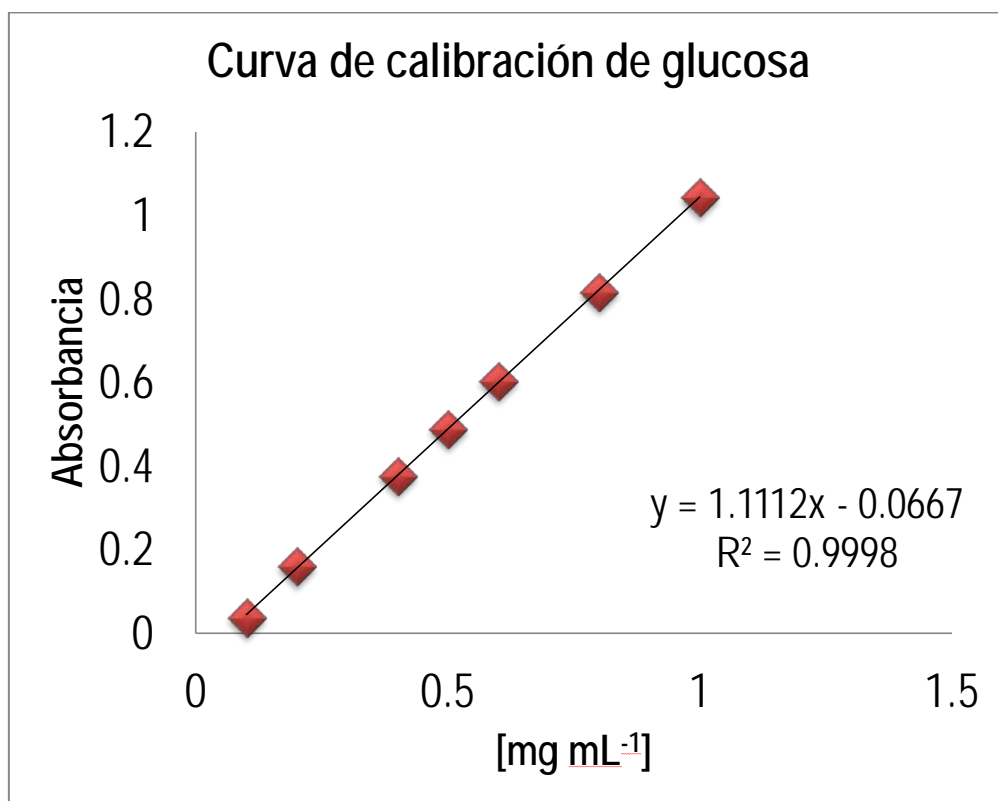


Fig 28. Curva de calibración para la determinación de glucosa.

Curva de calibración de nitrógeno

Cuadro 11. Curva de calibración para la determinación de nitrógeno

mg N₂ L⁻¹	A₆₆₂
0.35	0.082
0.7	0.134
1.4	0.339
2.1	0.508
3.5	0.796
4.2	0.962
5.6	1.3
7	1.595

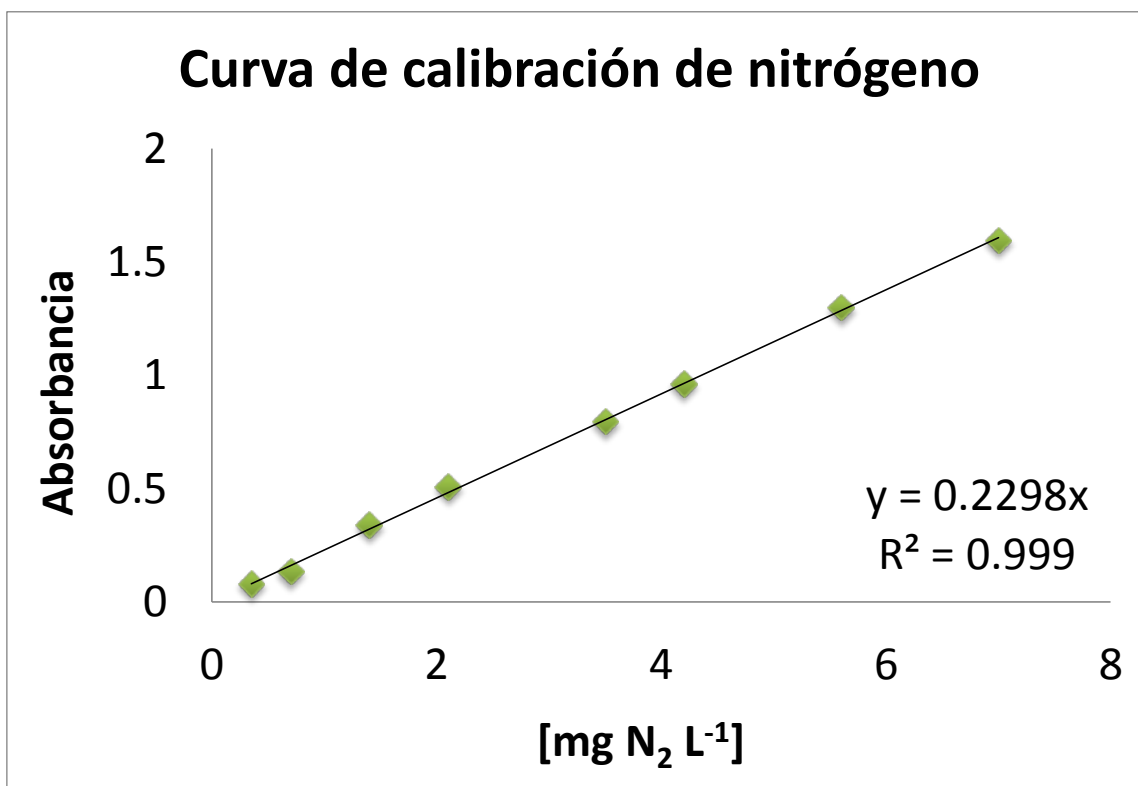


Fig 29. Curva de calibración para la determinación de nitrógeno.

Curva de calibración de fosfatos

Cuadro 12. Curva de calibración para la determinación de fosfatos

mg L⁻¹	A₆₉₀
5	0.181
10	0.362
15	0.541
20	0.723
25	0.9

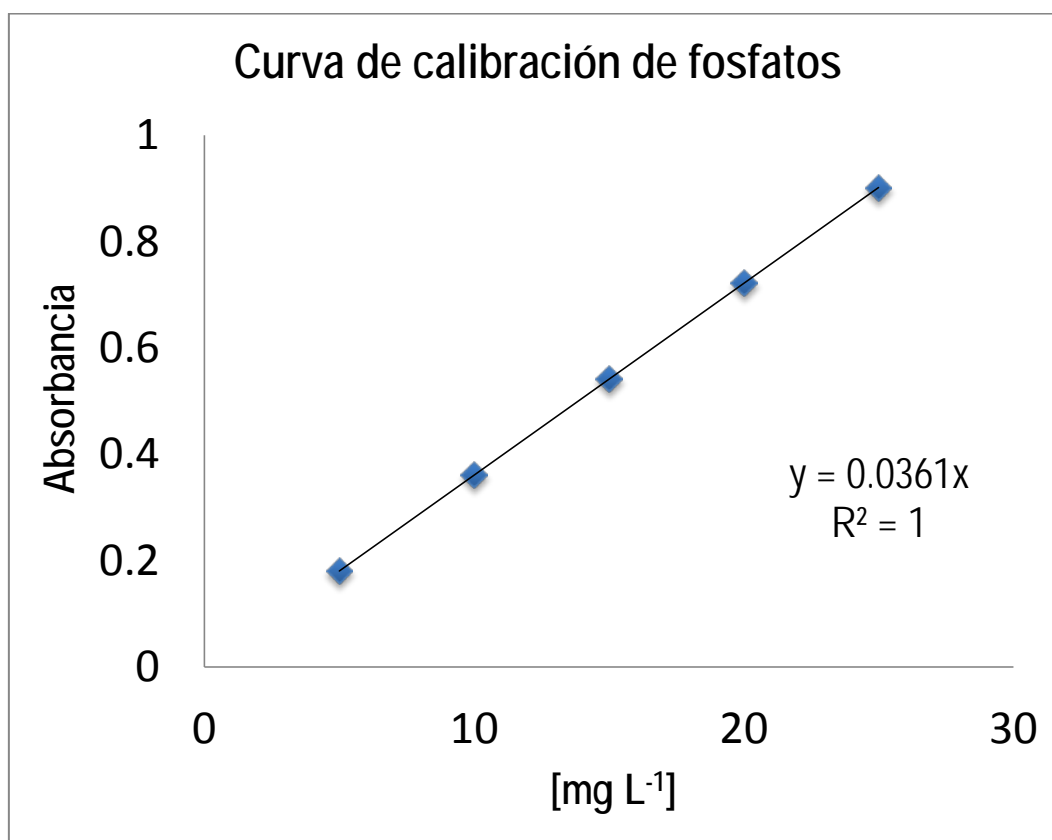


Fig 30. Curva de calibración para la determinación de fosfatos.

Curva de calibración de ácido giberélico

Cuadro 13. Datos de conversión de ácido giberélico a ácido giberelénico

Tiempo (s)	100 (mg L ⁻¹)	250 (mg L ⁻¹)	500 (mg L ⁻¹)	800 (mg L ⁻¹)	1000 (mg L ⁻¹)
0	0	0	0	0	0
20	0.007	0.015	0.027	0.035	0.05
40	0.013	0.029	0.046	0.073	0.099
60	0.019	0.041	0.067	0.108	0.144
80	0.025	0.053	0.087	0.144	0.189
100	0.03	0.067	0.107	0.175	0.233
120	0.035	0.078	0.125	0.208	0.274

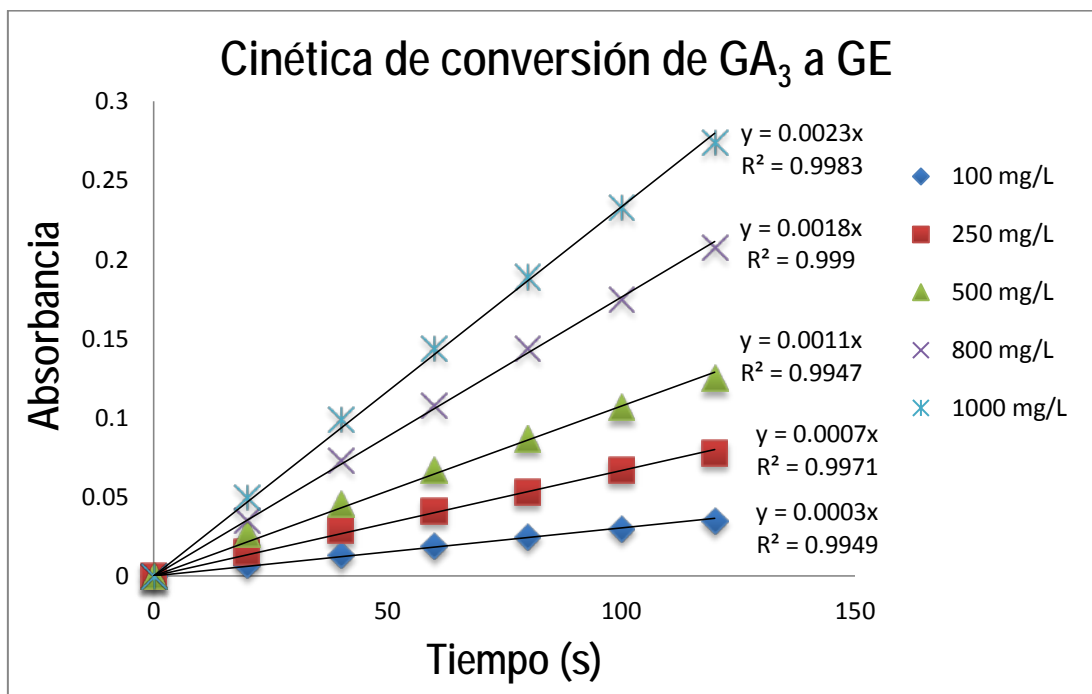


Fig 31. Cinética de conversión de ácido giberélico a ácido giberelénico.

Cuadro 14. Curva de calibración para la determinación de ácido giberélico

mg L ⁻¹	Pendiente
100	0.0003
250	0.0007
500	0.0011
800	0.0018
1000	0.0023

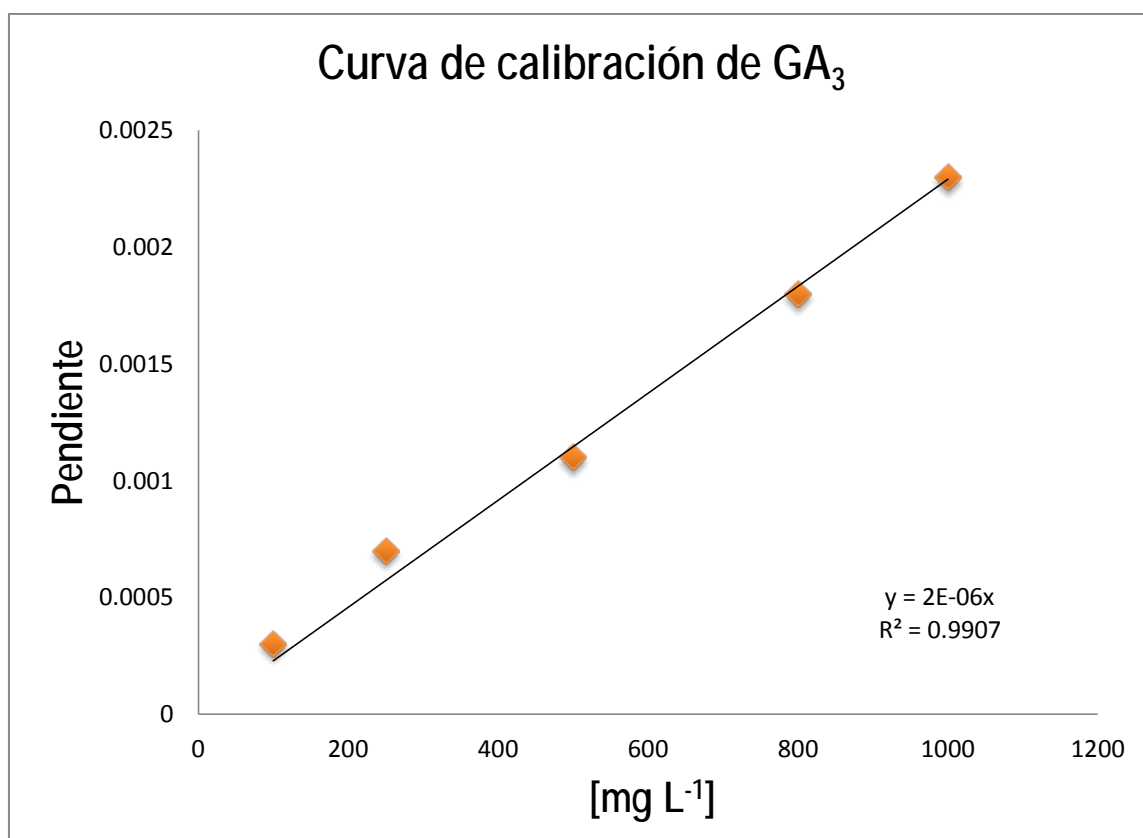


Fig 32. Curva de calibración para la determinación de ácido giberélico.

Abreviaturas

%	porcentaje
°C	Grados centígrados
μL	microlitros
μm	micrómetro
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
CE-MS	Electroforesis capilar combinada con espectrometría de masas
CINVESTAV-IPN	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
CPS/KS	<i>Ent</i> -copalil difosfato/ <i>ent</i> -kaureno sintasa
Des	Desaturasa
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
FDP	Farnesil difosfato
FppS	Farnesil difosfato sintasa
g	Gramos
GA ₃	Ácido giberélico
GAs	Giberelinas
GC	Cromatografía de gases

GC-MS	Cromatografía de gases combinada con espectrofotometría de masas
GDP	Geranil difosfato
GE	Ácido giberelénico
GGDP	Geranil geranil difosfato
GS	Glutamina sintasa
h	Horas
Hmg-CoA	Hidroximetilglutaril coenzima A
HmgR	Hidroximetilglutaril coenzima A reductasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IPP	Isopentenil difosfato
Kg	Kilogramo
L	Litros
lb	Libra
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Espectrofotometría de masas
nm	Nanómetro
PDA	Agar dextrosa papa
pH	Potencial de hidrógeno

psi	Libra por pulgada cuadrada
RNA	Ácido ribonucleico
s	Segundos
sp.	Especie biológica
subsp.	Subespecies
UV	Ultravioleta