



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

**Efecto del Uso de la Fuente de Carbono Mixta  
Glucosa-Glicerol sobre la Producción de Ácido  
Giberélico en Cultivo Sumergido del Hongo  
*Gibberella fujikuroi***

**T E S I S**

que presenta  
**IBQ Alfredo Molina Gaxiola**

para obtener el grado de  
**Maestría en Ciencias con  
Orientación en  
Biotecnología Agroalimentaria**

**Director de Tesis  
Dra Erika Yudit Rios Iribe  
Dr Oscar Martín Hernández Calderón**

**Culiacán Rosales, Sinaloa, México**

**Julio 2016**

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. Jesús Raúl Ortiz del Castillo, Dr. Ignacio Contreras Andrade, Dr. Luis Martín Sánchez Magaña, Dra. Erika Yudit Rios Iribe (Director de Tesis) y Dr. Oscar Martín Hernández Calderón (Director de Tesis). El desarrollo experimental se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería FCQB-UAS. Además, se requirió el uso de las instalaciones de los Laboratorios de Química de Productos Naturales y Biocombustibles FCQB-UAS. Esta investigación recibió soporte económico del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) – UAS [Apoyo a la Incorporación de Nuevos Profesores de Tiempo Completo - Oficio *PROMEP/103.5/12/3360, FOLIO UAS-NPTC-059*] y del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) [Folio PROFAPI2014/175]. El alumno Alfredo Molina Gaxiola recibió Beca para Estudios de Posgrado (Estudios de Maestría 2014-2016) a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero agradecer a mi familia comenzando con mis **padres, Alfredo Molina y Guadalupe Gaxiola** por todo el apoyo constante e incondicional que me han brindado durante toda mi vida, por estar al pendiente en todo momento de mí, por ayudarme a salir a delante en cada etapa de mi vida, a mis hermanos, **Romario y Azucena** por estar ahí siempre para brindarme momentos únicos en la vida, sonrisas y sobre todo la confianza de saber que cuento con ellos en cualquier momento, gracias hermanos por todo el amor que comparten en el día a día conmigo.

A la **Dra. Erika Rios** le agradezco enormemente la oportunidad que me otorgó para ser partícipe de este gran proyecto de investigación, por transmitirme los conocimientos necesarios para el cumplimiento y la culminación del mismo y sobretodo muchas gracias por creer en mí y darme la confianza necesaria para llevar a cabo esta travesía.

Al **Dr. Oscar Hernández** por estar apoyando constantemente para que el proyecto saliera adelante, por toda la asesoría que me brindo para el desarrollo de mi tesis y por la amistad sincera que lo caracteriza.

A mi familia del laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería **Ana Sofía, Danitsa, Gilberto, Nidia, Lulú, Julio y Adán** por todos los buenos momentos, apoyo y trabajo en equipo, además de la amistad forjada en todo este tiempo.

A **Yudith Escobar** por estar siempre al pendiente de mí, por ayudarme en la culminación de este gran logro, por motivarme a siempre ser una mejor persona, y te agradezco sobre todo por ser mi compañera y amiga.

Al **Dr. Julio Montes**, le agradezco darme la oportunidad de trabajar bajo su asesoría y compartirme sus espacios de trabajo, su tiempo, sus conocimientos y, sobre todo, su buen humor.

A todos los buenos amigos que conocí en el laboratorio de Química de Productos Naturales **Oscar, Alma, Gisela, Almita, Pedro, Alexis, Carlitos y Martín**, gracias a todos ustedes por toda la ayuda y amistad que me brindaron en todo momento al utilizar sus instalaciones.

A **Oscar Sánchez**, por ser más que un compañero y amigo, te convertiste en un hermano, me diste tu confianza y apoyo durante toda esta trayectoria, gracias por todas las ocasiones en las que te diste el tiempo de ayudarme y escucharme.

Por último quiero agradecer al elenco del laboratorio 18, a la **Dra. Edith Cuevas, Yuriana, Evelyn, Radamés, Charlie, Diana, Ernesto y Anita**, por su amistad, risas y todos los buenos momentos.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	v
<b>I RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>II INTRODUCCIÓN</b>	4
<b>III REVISIÓN DE LA LITERATURA</b>	6
A Historia	6
B Generalidades	8
C Clasificación de las GAs	9
D Propiedades físicas, químicas y biológicas de las GAs	9
E Usos del GA <sub>3</sub>	12
F Ruta biosintética de las GAs en <i>Gibberella fujikuroi</i>	14
G Forma de obtención de las GAs	18
1 Síntesis química	18
2 Extracción de plantas	18
3 Cultivo microbiano	19
H Proceso de cultivo microbiano	20
I Cultivo sumergido	20
J Microorganismo productor	21
1 <i>Gibberella fujikuroi</i>	22
2 Fases de crecimiento de <i>Gibberella fujikuroi</i>	25
a. Fase Lag	25
b. Fase exponencial	25
c. Fase estacionaria	25
d. Fase terminal	26
K Metabolismo secundario microbiano	26
L Observaciones generales en la expresión de los metabolitos de hongos	27
M Biorreactor	27
N Modificaciones del medio de cultivo	30
1 Macronutrientes	32
a. Fuente de nitrógeno	32
b. Fuente de carbono	33
1) Fuente de carbono mixta	33
c. Otros macronutrientes	35
2 Micronutrientes	35
3 Condiciones fisicoquímicas del cultivo necesarias	36
a. pH	36
b. Temperatura	37

c. Aireación	37
d. Luz	38
O Modelo matemático	38
<b>IV JUSTIFICACIÓN</b>	40
<b>V HIPOTESIS</b>	41
<b>VI OBJETIVOS</b>	42
A Objetivo general	42
B Objetivos específicos	42
<b>VII MATERIALES Y MÉTODOS</b>	43
A MATERIALES	43
1 Material biológico	43
B MÉTODOS	43
1 Preparación de los medios de cultivo	43
2 Condiciones de cultivo	44
3 Toma de muestra	46
a Determinación de biomasa	46
b Cuantificación de glucosa	48
c Cuantificación de glicerol	49
d Determinación de nitrógeno amoniacal	49
e Determinación de fosfatos	50
f Cuantificación del ácido giberélico	51
<b>VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	53
A Cultivo microbiano a nivel reactor para la producción de GA <sub>3</sub>	53
B Producción de GA <sub>3</sub>	63
C Análisis y modelamiento cinético	70
<b>XI CONCLUSIONES</b>	83
<b>X BIBLIOGRAFIA</b>	84
<b>XI ANEXOS</b>	94
Apéndice A: Preparación de reactivos	94
1 Determinación de glucosa	94
2 Determinación de glicerol	95
3 Determinación de nitrógeno	95
4 Cuantificación de fosfatos	96
5 Cuantificación de GA <sub>3</sub>	97
Apéndice B: Curva de calibración	98
1 Determinación de glucosa	98
2 Determinación de glicerol	99
3 Determinación de nitrógeno amoniacal	100
4 Determinación de fosfatos	101
5 Cuantificación del ácido giberélico	102
Apéndice C: Datos de velocidad específica de crecimiento del modelo logístico	104
Abreviaturas	107

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig	Descripción	Pág
1	Estructura de giberelinas	10
2	Estructura general de las giberelinas	11
3	Esquema de la descripción general de la ruta de los isoprenoides y la biosíntesis de giberelinas en <i>Gibberella fujikuroi</i>	17
4	Primeros pasos e intermedios de la biosíntesis de GAs en plantas superiores y del hongo <i>Fusarium fujikuroi</i>	23
5	Últimos pasos en la biosíntesis de GAs, en tejidos de plantas, endospermo de calabaza y el hongo <i>Fusarium fujikuroi</i>	24
6	Esquema general de un biorreactor <i>airlift</i>	29
7	Biorreactor tipo <i>airlift</i> utilizado para los experimentos de este proyecto de investigación.	45
8	Esquema general de trabajo durante los experimentos realizados de cultivo microbiano	47
9	Cinéticas de producción de biomasa y ácido giberélico y consumo de la fuente de carbono en el experimento donde se empleó la fuente de carbono mixta	54
10	Cinética de producción de biomasa y ácido giberélico y consumo de nitrógeno y fosfato utilizando fuente de carbono mixta	55
11	Cinéticas de producción de biomasa y ácido giberélico y consumo de la fuente de carbono en el experimento donde se empleó solo glucosa como fuente de carbono	57
12	Cinética de producción de biomasa y ácido giberélico y consumo de nitrógeno y fosfato del experimento donde se utilizó solo glucosa como fuente de carbono	58
13	Cinéticas de producción de biomasa y ácido giberélico y consumo de la fuente de carbono en el experimento donde se empleó solo glicerol como fuente de carbono	61
14	Cinética de producción de biomasa y ácido giberélico y consumo de nitrógeno y fosfato del experimento donde se utilizó solo glicerol como fuente de carbono	62
15	Cinéticas de producción de ácido giberélico de los experimentos utilizando distintas fuentes de carbono	64
16	Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de sustrato empleando la fuente mixta de carbono	73
17	Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de sustrato empleando solo glucosa como fuente carbono	74

18	Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de sustrato empleando solo glicerol como fuente carbono	75
19	Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de nitrógeno en el experimento donde se utilizó la fuente mixta de carbono	80
20	Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de nitrógeno en el experimento donde se empleó solo glucosa como fuente carbono	81
21	Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de nitrógeno en el experimento donde se empleó solo glicerol como fuente carbono	82
22	Curva de calibración para cuantificar el sustrato glucosa.	98
23	Curva de calibración para cuantificar glicerol.	99
24	Curva de calibración empleada para la determinación de nitrógeno residual.	100
25	Curva de calibración utilizada para determinar fosfatos.	101
26	Gráfica para obtener las pendientes para la realización de la curva.	102
27	Curva de calibración para la determinación de ácido giberélico.	103
28	Gráfica de la velocidad específica de crecimiento contra el tiempo para el experimento donde se utilizó la fuente mixta de carbono.	104
29	Gráfica de la velocidad específica de crecimiento contra el tiempo para el experimento donde se utilizó glucosa como fuente de carbono.	105
30	Gráfica de la velocidad específica de crecimiento contra el tiempo para el experimento donde se utilizó glicerol como fuente de carbono.	106



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág
1	Aplicaciones del GA <sub>3</sub>	15
2	Características de biorreactores <i>airlift</i> y tanque agitado	31
3	Análisis de varianza de la producción de biomasa utilizando las diferentes fuentes de carbono	59
4	Producción máxima de ácido giberélico y biomasa durante los experimentos de cultivo microbiano	65
5	Análisis de varianza de la producción de ácido giberélico utilizando las diferentes fuentes de carbono	68
6	Comparación de medias de los diferentes experimentos en la producción de ácido giberélico mediante la prueba de Tukey	69
7	Parámetros de ajuste del modelo logístico para la cinética de producción de biomasa de todos los tratamientos	72
8	Parámetro de ajuste del modelo logístico para la cinética de consumo de las diferentes fuentes de carbono	77
9	Parámetro de ajuste del modelo logístico para la cinética de consumo de la fuente de nitrógeno utilizando diferentes fuentes de carbono	79
10	Datos para la realización de la curva de calibración para determinar glucosa	98
11	Datos para la realización de la curva de calibración para determinar glicerol	99
12	Datos para la construcción de la curva de calibración para determinar nitrógeno amoniacal	100
13	Datos para la construcción de la curva de calibración para determinar fosfatos	101
14	Datos para la construcción de la curva de calibración para la medición del ácido giberélico.	102
15	Pendientes para la realización de la curva de calibración para determinar ácido giberélico	103
16	Datos de $\mu$ vs t para el experimento donde se utilizó la fuente mixta de carbono	104
17	Datos de $\mu$ vs t para el experimento donde se utilizó glucosa como fuente de carbono	105
18	Datos de $\mu$ vs t para el experimento donde se utilizó glicerol como fuente de carbono	106

## I. Resumen

El ácido giberélico ( $GA_3$ ) es el principal metabolito secundario producido por el hongo *Gibberella fujikuroi*, y es ampliamente utilizado en la agricultura debido a su capacidad de acelerar los procesos biológicos relacionados con el crecimiento de plantas superiores. Se han propuesto numerosas estrategias para incrementar la producción de  $GA_3$  vía cultivo microbiano de *G. fujikuroi*, entre las cuales destaca el uso simultáneo de dos o más fuentes de carbono. En este proyecto de investigación se analizó el efecto de la fuente de carbono (considerando una base de  $40 \text{ g L}^{-1}$  de C total): glucosa, glicerol y una fuente mixta glucosa:glicerol en una proporción 1:2, sobre la producción de  $GA_3$  a partir de *G. fujikuroi* H-984 en un sistema de cultivo sumergido por lotes, utilizando un biorreactor *airlift*. Para estudiar dicho efecto se realizaron cinéticas de crecimiento y consumo de sustratos (glucosa, glicerol, nitrógeno y fosfatos). Se encontró que al utilizar glucosa como fuente de carbono se produjo la menor concentración de  $GA_3$  ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ) a las 216 h de cultivo, mientras que al utilizar glicerol como única fuente de carbono se obtuvo una máxima producción de  $0.7 \text{ g L}^{-1}$  a las 288 h de cultivo. A pesar de que con glicerol se produjeron  $0.2 \text{ g L}^{-1}$   $GA_3$  más que en el experimento donde se utilizó únicamente glucosa, el análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas en la producción de  $GA_3$  entre ambas condiciones de estudio; la fuente mixta glucosa-glicerol obtuvo la máxima producción de  $GA_3$  de  $0.9 \text{ g L}^{-1}$  a las 288 h de cultivo, resultado que fue validado por la prueba de comparación de medias de Tukey la cual indicó que sí existe diferencias significativas comparado con los experimentos que utilizaron una fuente única de carbono. Además se propuso un modelo matemático para predecir el comportamiento del crecimiento del hongo, y consumo de la fuente de carbono y nitrógeno durante el proceso de cultivo microbiano, dando como resultado un buen ajuste entre los valores experimentales y los obtenidos por el modelo. El uso de distintas fuentes de

carbono afecta la concentración máxima de producción de GA<sub>3</sub>, siendo la mejor alternativa el uso de la fuente de carbono mixta glucosa-glicerol, bajo estas condiciones de estudio.

**Palabras claves** *Gibberella fujikuroi*, fuente mixta, biorreactor *airlift*.

## Abstract

Gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) is the main secondary metabolite produced by the fungus *Gibberella fujikuroi*, and is widely used in agriculture due to its ability to accelerate the biological processes related to the growth of higher plants. Several strategies have been proposed to increase production of GA<sub>3</sub> through microbial culture by *G. fujikuroi*, among which is the simultaneous use of two or more carbon sources. In this research was analyzed the effect of carbon source (assuming a basis of 40 g L<sup>-1</sup> total C): glucose, glycerol and a mixed source glucose:glycerol in a proportion of 1:2, on the production of GA<sub>3</sub> from *G. fujikuroi* H-984 in a batch system submerged culture using an airlift bioreactor. To study this effect were performed kinetics of biomass growth and consumption of the substrates (glucose, glycerol, nitrogen and phosphate). It was found that when using glucose as carbon source produced the lowest concentration of GA<sub>3</sub> (0.5 g L<sup>-1</sup>) at 216 h of culture, while using glycerol as the sole carbon source a maximum output of 0.7 g L<sup>-1</sup> was obtain at 288 h of culture. Although glycerol produced 0.2 g L<sup>-1</sup> more than in the experiment where only glucose was used, the statistical analysis indicated that there aren't significant differences in the production of GA<sub>3</sub> between both experiments. On the other hand, the mixed source glucose-glycerol had a maximum output of GA<sub>3</sub>, 0.9 g L<sup>-1</sup> at 288 h of culture, that result was validated by Tukey's test, which it indicates that there are significant differences compared to experiments using a single carbon source. Also it proposed a mathematical model to predict the behavior of fungal culture, resulting in a good fit between the experimental values and those obtained by the model. The use of different carbon sources affects the maximum concentration of GA<sub>3</sub> production, being the best alternative the glucose-glycerol mixture under these conditions of study.

**Keywords** *Gibberella fujikuroi*, mixed source, airlift bioreactor.

## II. INTRODUCCIÓN

Los hongos tienen un fuerte impacto en la producción de nuevos metabolitos de interés utilizados en numerosas aplicaciones. Son considerados como una prominente fuente de compuestos químicos, los cuales son utilizados en farmacéutica, agroquímicos, comida e industria cosmética (Takahashi y col., 2013). *Gibberella fujikuroi* es un hongo productor de un gran número de idiolitos entre ellos se encuentran las giberelinas (fitohormona) siendo la más importante de ellas el ácido giberélico ( $GA_3$ ) desde el punto de vista industrial, ya que puede ser producido vía cultivo microbiano en altas concentraciones. El  $GA_3$  es una hormona que influye en los procesos relacionados con el crecimiento de plantas, por ejemplo, estimula la germinación en semillas, aumenta el crecimiento de brotes, e incluso ayuda en el proceso de mitosis de algunas plantas. En vista de los beneficios que poseen las giberelinas en las plantas, se han empleado diversas estrategias para aumentar la producción de  $GA_3$ , entre las cuales se encuentran: variar la composición del medio de cultivo, selección de la mejor cepa, utilizar diferentes modalidades de cultivo (por ejemplo: cultivo sumergido, estado sólido, sistemas de lote alimentado, etc.), la optimización de las condiciones del medio de cultivo (por ejemplo: temperatura, aireación, pH y agitación) y por último, está la utilización de diferentes configuraciones del reactor (tanque agitado, *airlift*, lecho fluidificado o arreglos de lecho empacado) (Ríos-Iribe y col., 2013). Sin embargo, la necesidad de incrementar la producción de  $GA_3$  a través de *G. fujikuroi*, ha llevado a la investigación del uso de nuevas fuentes de carbono siendo una alternativa interesante el uso de glicerol como fuente de carbono, ya que este sustrato es un subproducto en el proceso de producción de biodiésel.

El principal objetivo de este trabajo fue estudiar la fuente mixta de glucosa: glicerol como una estrategia alternativa para incrementar la producción de  $GA_3$  por medio de *G. fujikuroi*, durante el proceso de cultivo microbiano. De

acuerdo con el análisis de resultados se observó un incremento en la producción de GA<sub>3</sub> al utilizar la fuente mixta glucosa: glicerol de al menos un 44% comparado con utilizar glucosa como única fuente de carbono y del 22% comparado con utilizar glicerol como única fuente de carbono. Es importante mencionar que en la actualidad no se han reportado estudios sobre la utilización de glicerol como fuente de carbono para la producción de GA<sub>3</sub>, lo cual hace este proyecto interesante e innovador.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### A. Historia

La historia de las giberelinas presenta dos paradigmas: (1) el descubrimiento de las giberelinas en hongos, su aislamiento de extractos fúngicos y la identificación de sus estructuras químicas; y, (2) el descubrimiento e investigación de sus efectos biológicos en plantas superiores.

La historia de las giberelinas comenzó en 1898 con un reporte de Hori acerca de la enfermedad de "*Bakanae*", una de las enfermedades del arroz más antiguas en el Oriente, especialmente en Japón, la cual presenta los siguientes síntomas: una elongación anormal del tallo, amarilleamiento de hojas, lesiones en las raíces, granos estériles o vacíos causando así una reducción en el rendimiento de las cosechas debido a su habilidad por producir giberelinas en grandes cantidades (Bömke y Tudzynski 2009; Albermann y col., 2013). Después de crecer rápidamente, la planta infectada, muere. Por tanto el daño en las plantas de arroz es extensivo, y puede reducir el rendimiento del arroz en un 40 % (Sawada, 1912). Hori detectó el agente causal y lo identificó como un hongo imperfecto transmitido del suelo; *Fusarium moniliforme*. El estado perfecto (sexual) del hongo es *Gibberella fujikuroi*.

El hongo *G. fujikuroi* fue descrito por primera vez en 1917 como *Lisea fujikuroi* por el patólogo de plantas japonés Sawada quien identificó al hongo como el agente causante de la enfermedad conocida como "*Bakanae*" (Sawada, 1917).

En 1926, el científico japonés Eiichi Kurosawa descubrió que la enfermedad era causada por una sustancia secretada por el patógeno *G. fujikuroi* (Bömke y Tudzynski 2009). Kurosawa tuvo éxito en inducir los síntomas típicos de la enfermedad de "*Bakanae*" en plántulas de arroz con filtrados de cultivo estéril después de eliminar el hongo. Llamó a este principio activo como "toxina" la cual presentaba las siguientes propiedades:

1. Aceleración del crecimiento del arroz.
2. Daño al crecimiento de la raíz e intromisión con la formación de clorofila.
3. Acción similar en plantas distintas al arroz.
4. Estabilidad a temperatura de 100 °C por 4 h.
5. Falta de formación de anticuerpos por la planta de arroz contra la toxina.

Fue de gran importancia el aislamiento de una sustancia cristalina del cultivo filtrado por el grupo de Yabuta en 1934. Sin embargo, esta sustancia no era muy activa incluso en altas concentraciones. La sustancia fue llamada como “ácido fusárico”, y fue identificada como un derivado del ácido picolínico. Al cambiar la composición del medio de cultivo fúngico Yabuta obtuvo extractos al cual denominó como “giberelina” en alusión al hongo *G. fujikuroi* (Yabuta, 1935; Bömke y Tudzynski 2009).

En 1938, Yabuta y Sumiki reportaron el aislamiento de dos sustancias cristalinas, las giberelinas A y B. Ambas sustancias fueron biológicamente activas, pero tenían diferentes propiedades químicas. Sin embargo, se encontró que las sustancias eran impuras.

Fue en 1950 cuando la empresa británica *Imperial Chemical Industry* (ICI) comenzó un programa de selección de cepas salvajes de *F. moliniforme* con gran capacidad para producir ácido giberélico, además hicieron intentos para optimizar las condiciones y los procedimientos de cultivo microbiano (Borrow y col., 1964).

En 1955, Takanashi y col., tuvieron éxito separando la giberelina A en tres componentes, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub>. Durante esta etapa, los científicos británicos descubrieron que las GAs son reguladores naturales del crecimiento y desarrollo en las plantas superiores (Brückner y Blechschmidt, 1991; Bömke y Tudzynski, 2009).



West y Phinney, en 1956 presentaron la primera evidencia de la presencia del ácido giberélico en plantas superiores. Descubrieron que el extracto de plantas superiores contiene sustancias que producen efectos biológicos similares a aquellos causados por el ácido giberélico. A partir de entonces se han hecho numerosos estudios y se han encontrado e identificado nuevas giberelinas ya sea de plantas superiores o de hongos (Albermann y col., 2013).

## **B. Generalidades**

Debido a que algunas giberelinas actúan como hormonas naturales en plantas superiores, en los últimos años se ha promovido su uso comercial en sectores productivos como la agricultura, la horticultura y la fitocultura con el propósito de aumentar el rendimiento de las cosechas, aumentar el peso de la planta y la elongación del tallo, ayudar en la expresión sexual, incrementar el tamaño de los frutos y acelerar el proceso de floración o la inducción de la actividad de enzimas hidrolíticas durante la germinación de semillas (Appleyard y col., 1995; Bomke, 2009; Albermann y col., 2013). La fuente comercial de giberelinas, reside principalmente en el compuesto bioactivo llamado GA<sub>3</sub>. El GA<sub>3</sub> es obtenido principalmente vía cultivo microbiano mediante el hongo patógeno del arroz conocido como *G. fujikuroi*, del cual las giberelinas fueron descubiertas inicialmente. Este hongo es capaz de producir grandes cantidades de GA<sub>3</sub> por medio de su metabolismo secundario. Se han realizado numerosas investigaciones que demuestran que la elección de la fuente de carbono en el proceso de cultivo microbiano incide directamente en el rendimiento de la producción de metabolitos, siendo la glucosa la más utilizada como fuente de carbono. Esto último está basado en el hecho de que la glucólisis está presente en una larga variedad de organismos vivos siendo la vía más rápida que permite cubrir los requerimientos energéticos de las funciones celulares. La producción de giberelinas a través de *G. fujikuroi* no ha sido la excepción, debido a que su principal línea de investigación está basada en el uso de

glucosa; incluso la máxima producción de GA<sub>3</sub> fue reportada utilizando esta fuente de carbono (Escamilla-Silva y col., 2000).

### C. Clasificación de las GAs

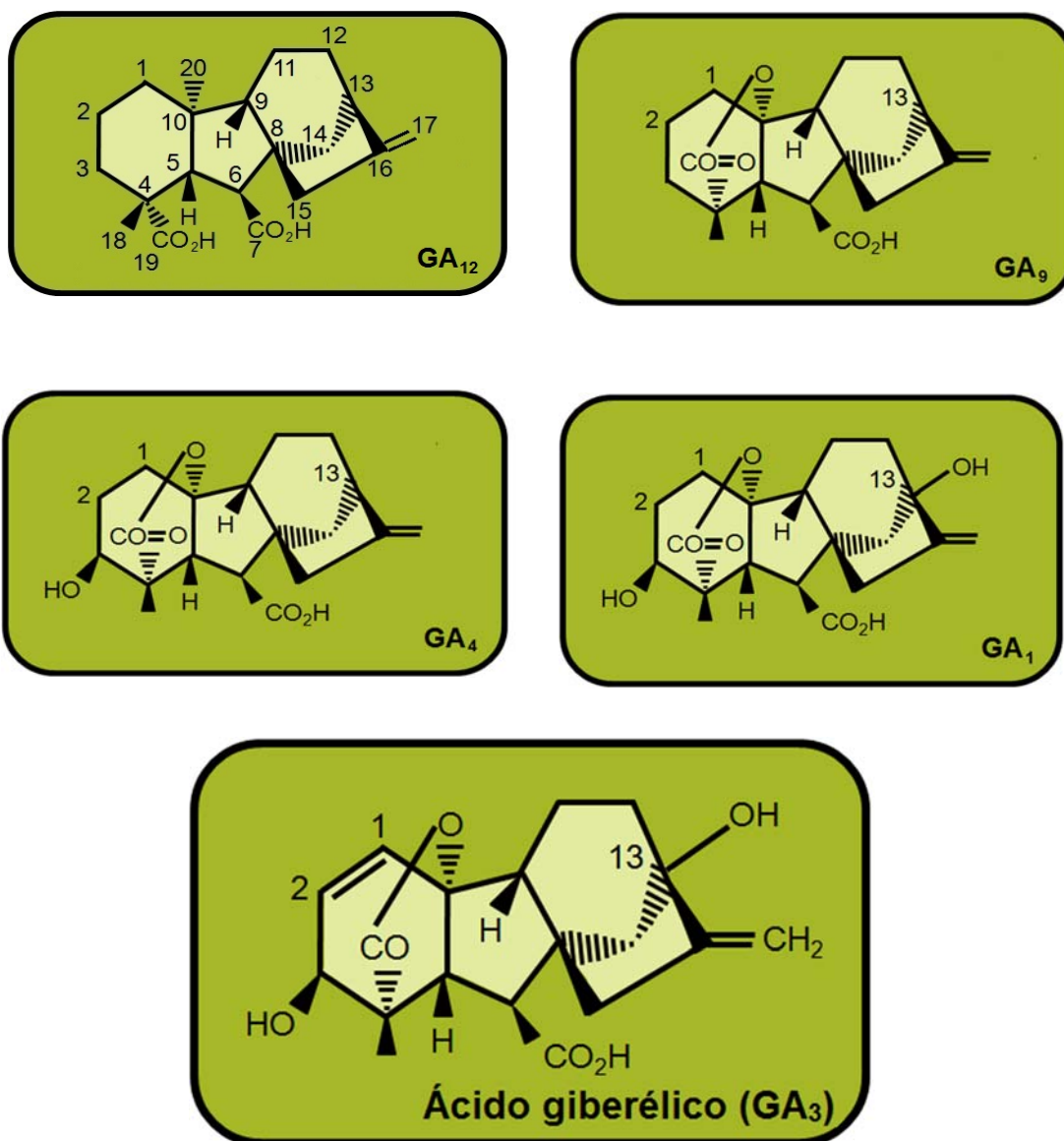
Existe una gran variedad de giberelinas las cuales se producen en condiciones similares, pero en cantidades diferentes. Las giberelinas se pueden clasificar dentro de dos grupos importantes (Brückner y Blechschmidt, 1991):

- a) Giberelinas C<sub>20</sub>: las cuales poseen un esqueleto completo diterpenoide con 20 átomos de carbono.
- b) Giberelinas C<sub>19</sub>: que derivan de las GAs-C<sub>20</sub> por eliminación del metilo en el C<sub>20</sub> como CO<sub>2</sub>. Todas las GAs bioactivas como fitohormonas son GAs-C<sub>19</sub>, entre las GAs más prominentes se encuentran: GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub> (**Figura 1**).

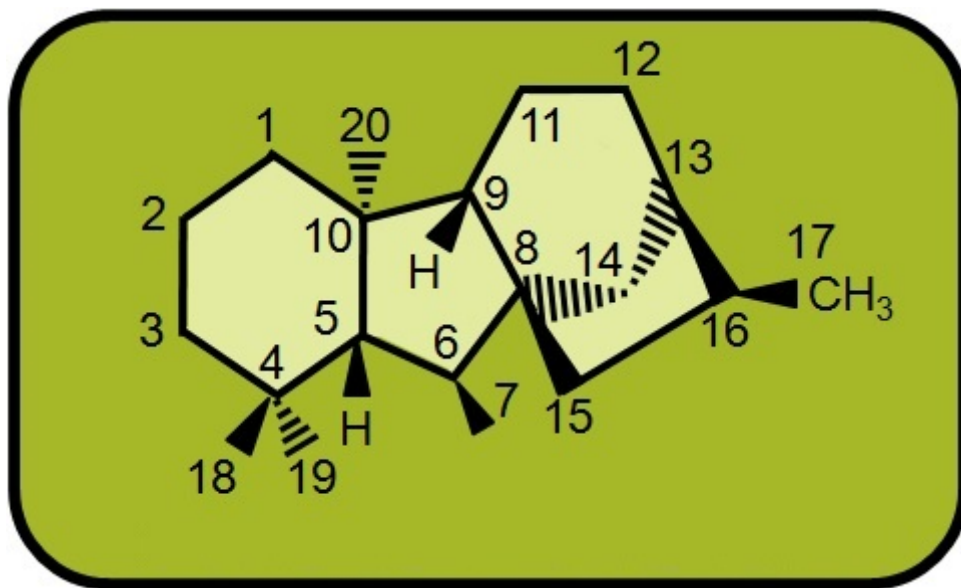
### D. Propiedades físicas, químicas y biológicas de las giberelinas

Químicamente hablando, las giberelinas son un grupo de al menos 136 compuestos de ácidos diterpenoides (denominados GA<sub>1</sub>-GA<sub>136</sub>) provenientes de plantas y hongos que poseen en su estructura el anillo *ent*-giberelano (**Figura 2**). Como se mencionó anteriormente, solo unas cuantas giberelinas presentan propiedades bioactivas, entre ellas se encuentra la de mayor interés comercial producida por el hongo *G. fujikuroi*, a esta giberelina se le nombró ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), cuyos precursores inmediatos son la GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>, así como la GA<sub>1</sub> (Albermann y col., 2013).

Químicamente, el GA<sub>3</sub> es un ácido tetracíclico dihidroxi  $\gamma$ -lactónico con dos enlaces etileno y un grupo ácido carboxílico libre, siendo su fórmula empírica la siguiente: C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub> (Shukla y col., 2003; Rodrigues y col., 2012). En la **Figura 1** se muestran la estructuras de las giberelinas más simples de 19 y 20 carbonos, así como las más bioactivas en plantas superiores (Hedden, 2012).



**Figura 1.** Estructura de giberelinas, está incluido el ejemplo más simple de giberelina de 20 carbonos (GA<sub>12</sub>), con el sistema de numeración de carbonos, así como la estructura de 19 carbonos de la giberelina más simple (GA<sub>9</sub>). También se muestran las principales giberelinas bioactivas en plantas superiores: GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub> (Hedden, 2012).



**Figura 2.** Estructura general de las giberelinas (esqueleto *ent-giberelano*) (Bömke y Tudzynski 2009).

Físicamente el GA<sub>3</sub> es un sólido blanco cristalino, soluble en agua hasta 5 g L<sup>-1</sup>. Es de fácil solubilidad en solventes orgánico como etanol, metanol, acetato de etilo, acetato de butilo y cetona. Es altamente estable en estado sólido, pero inestable en solución acuosa. La vida media en solución acuosa está en el orden de 14 días a 20°C y 2 horas a 50°C. En soluciones acuosas el GA<sub>3</sub> posee un pH de 3 a 4 (Brückner y Blechschmidt, 1991). Es importante mencionar que el sistema de anillos de las giberelinas puede estar sujeto a procesos degradativos, los cuales juegan un papel importante en los procesos de cultivo y de recuperación; por ejemplo, alteraciones en el valor de pH puede dar lugar a transformaciones irreversibles transformando el GA<sub>3</sub> (forma biológica activa) a iso-GA<sub>3</sub> (forma biológica inactiva) (Brückner y Blechschmidt, 1991).

Los tejidos de las plantas usualmente contienen 0.001 a 1.0 mg de GA<sub>3</sub> por kg de peso fresco. Diversas giberelinas son generalmente encontradas en las mismas plantas, y su patrón de variación puede cambiar dependiendo de la etapa de desarrollo. La sensibilidad a diversos efectos causados por diferentes giberelinas puede variar dependiendo del género de planta, los órganos y la etapa de desarrollo (Brückner y Blechschmidt, 1991). Las GAs parecen estar involucradas en todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de plantas, pero su característica más típica es el crecimiento pronunciado del tallo. Las giberelinas activas muestran muchos efectos fisiológicos, cada una en función del tipo de giberelina presente, así como la especie de planta.

### **E. Usos del GA<sub>3</sub>**

El ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>) es la hormona de crecimiento vegetal más importante en el aspecto comercial, la cual ha ganado bastante atención alrededor del mundo debido a su efectivo uso en la agricultura y en la industria cervecera (Shukla y col., 2003).

El GA<sub>3</sub> controla muchos procesos biológicos de desarrollo en plantas, tales como la inducción de la actividad hidrolítica enzimática (Foury, 1977; Schrader, 1994; García y col., 1999; Crow y col., 2006).

Los efectos del tratamiento precosecha con ácido giberélico en el control de la pudrición de fruta han sido investigados anteriormente (Eshel y col., 2000) (Kinay y col., 2005). Además, los tratamientos post-cosecha de frutas con GAs juegan un papel en el retraso de la senescencia, lo que retrasa la maduración aumentando así su vida de anaquel (Baldwin, 2003); (Ludford, 2003) y la inducción de resistencia a patógenos (Afek y col., 1993).

La combinación de GA<sub>3</sub> (2 mg mL<sup>-1</sup>) con *Cryptococcus laurentii* podría inducir respuestas fisiológicas complejas y diferenciales, relacionadas con la inducción de la resistencia y el retraso de la senescencia en pera (Yu y col., 2006).

Durante el otoño, el tratamiento inducido de GA<sub>3</sub> en cítricos reduce la floración en un 50% en la siguiente temporada, dependiendo de la concentración utilizada (Otmani y col., 2000). La misma observación se hizo para la producción de albaricoques, entre mayo y julio (Southwick y col., 1995). Para la producción de duraznos, se han logrado resultados similares, también se ha demostrado que la respuesta depende del estado de desarrollo del árbol en el que se aplique el tratamiento, así como la concentración y el volumen de la hormona aplicada a éste (Taylor y Geiser-Taylor, 1998; Baviera y col., 2002)

De acuerdo con González-Rossia y col., en el 2006, el uso de concentraciones de GA<sub>3</sub> de 50 mg L<sup>-1</sup> son suficientes para reducir el número de flores entre un 40 y 25% en los cultivares de ciruelo japonés “Black Gold” y “Black Diamond” respectivamente. La combinación de 20 mM de Ca<sup>+2</sup> con 1 μM de GA<sub>3</sub> en la producción de frijol Faba aumenta la altura de la planta, el peso fresco y seco del brote, la longitud y el tamaño de la raíz, así como el peso

fresco y seco de esta, el contenido relativo de agua y clorofila, antocianinas y la actividad enzimática de la anhidrasa carbónica (Al-Whaibi y col., 2010).

Entre las principales aplicaciones comerciales se encuentran (Monteiro-Machado y Soccol, 2007):

- Manejo de los cultivos de frutas: la mayoría de las uvas de mesa sin semilla ahora se cultivan con la aplicación de GA<sub>3</sub>; la inhibición de la senescencia de los cítricos mantiene la cáscara en mejores condiciones; control de desórdenes en la cáscara de manzanas variedad “*golden delicious*”.
- Producción de plantas ornamentales: induce la florescencia ya sea antes de lo habitual, o fuera de temporada. La floración esporádica en algunas plantas es a menudo un problema con los fitomejoradores, pero puede ser mejorada con aplicaciones de GAs.
- Malteado de cebada: 2-3 días pueden ser ahorrados por la adición de concentraciones de entre 25 y 500 µg de GA<sub>3</sub> por cada kg de cebada.
- Extensión de la caña de azúcar: incremento en el crecimiento del tallo y en el rendimiento de azúcar (Jordán y Casaretto, 2006).

El costo de GA<sub>3</sub> ha restringido su aplicación en el crecimiento y desarrollo de plantas, excepto para aquellas de alto valor comercial (Shukla y col., 2005; Karakoç y Aksöz, 2006).

Otras aplicaciones del GA<sub>3</sub> se muestran en el **Cuadro 1**.

#### **F. Ruta biosintética de las giberelinas en *Gibberella fujikuroi***

La biosíntesis de giberelinas comienza con la condensación de dos moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA), dando como resultado la formación del hidroximetilglutaril coenzima A (Hmg-CoA) que es subsecuentemente reducido a mevalonato por la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HmgR). Se ha encontrado que este paso es limitante en la ruta de

**Cuadro 1.** Aplicaciones del GA<sub>3</sub>.

<b>Aplicaciones</b>	<b>Efecto</b>
Efecto de GA <sub>3</sub> y cloruro de calcio en la restauración de las alteraciones metabólicas causadas por estrés salino en linaza	Incrementa la altura en plantas, el número de ramas y de hojas y el área de las hojas
Influencia todos los parámetros vegetativos en fresas “Chandler”	Altura de la corona, extensión de la corona, longitud del peciolo, número de hojas y área foliar
Efecto sobre la polinización de mandarina Clementina para la obtención de frutos sin semillas	Afecta a la fertilización actuando en la ovulación bajo condiciones de polinización cruzada.
Plantas de maíz ( <i>Zea mays</i> )	Contrarresta el efecto del estrés salino
Semillas de chícharo ( <i>Pisum sativum</i> )	Estimula el crecimiento de brotes
Tubérculos de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> )	Promueve la multiplicación y elongación celular y rompe la dormancia
Duraznos ( <i>Prunus pérsica</i> )	Inhibe la floración
Lichi ( <i>Litchi chinensis</i> )	Incrementa el peso del fruto
Maracuyá ( <i>Passiflora edulis</i> )	Efecto sobre la germinación ya que rompe la dormancia
Uvas ( <i>Vitis vinífera</i> )	Puede incrementar la masa y el número de bayas y reduce el número de semillas
Caña ( <i>Saccharum officinarum</i> )	Aumenta la elongación del tallo

Rodrigues y col., (2012)



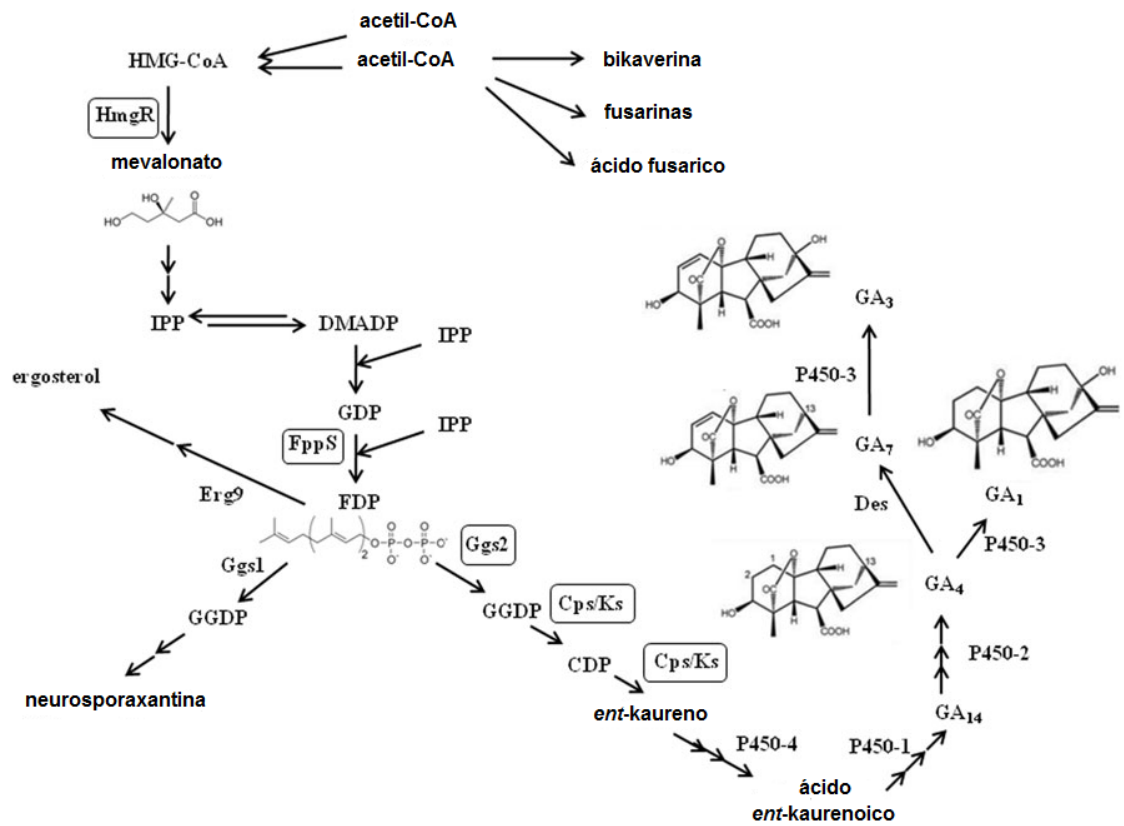
isoprenoides ya que el mevalonato constituye el intermediario clave para su síntesis (Woitek y col., 1997).

El mevalonato es subsecuentemente convertido a isopentenil difosfato (IPP), dimetilalil difosfato (DMADP), y geranil difosfato (GDP) a farnesil difosfato (FDP). El último paso es catalizado por la farnesil difosfato sintasa (FppS) (Homann y col., 1996; Tudzynski, 2005).

FDP puede ser empleado en la producción de metabolitos primarios, por ejemplo en la biosíntesis de ergosterol y ubiquinona, o puede ser empleado como sustrato de la geranilgeranil difosfato sintasa (Ggs) que cataliza la síntesis de geranilgeranil difosfato (GGDP) a partir de FDP e IPP. *Gibberella fujikuroi* tiene dos diferentes genes que codifican GGDP sintasa, *ggs1* y *ggs2* (Mende y col., 1997; Tudzynski y Hölter, 1998) esta última forma parte del clúster de genes de la biosíntesis de giberelinas. Mientras que la *Ggs1* es responsable de la formación de ubiquinona y de la neurosporaxantina, *Ggs2* constituye la primera enzima de la biosíntesis de giberelinas (Albermann y col., 2013).

Cuando el GGDP es sintetizado por la *Ggs2* se convierte en *ent*-kaureno vía *ent*-copalil difosfato en una reacción de ciclación de dos pasos catalizada por la diterpeno ciclasa *Cps/Ks*. La siguiente secuencia de oxidaciones a través del ácido *ent*-kaurenoico y  $GA_{12}$ , es catalizada por los citocromos P450-4 (*ent*-kaureno oxidasa) y P450-1 ( $GA_{14}$  sintasa) monooxigenasas, permiten la formación del  $GA_{14}$ . La pérdida del carbono 20 es una secuencia oxidativa catalizada por la P450-2 20-oxidasa, resultando la formación de la primera giberelina bioactiva,  $GA_4$ . Por último,  $GA_4$  es desaturada para convertirse en  $GA_7$ , quien a su vez es convertido en el producto principal,  $GA_3$ , por hidroxilación en el C-13 (Albermann y col., 2013).

En la **Figura 3** se resume la ruta biosintética del ácido giberélico a partir de dos moléculas de acetil-CoA.



**Figura 3.** Esquema de la descripción general de la ruta de los isoprenoides y de la biosíntesis de giberelinas en *Gibberella fujikuroi*. Las enzimas claves están resaltadas por cuadrados; los principales intermediarios o productos finales de la síntesis están indicados en letras oscuras. Las flechas continuas indican los pasos secuenciales de la biosíntesis, los cuales fueron eliminados para simplificar el esquema (Albermann y col., 2013).

## **G. Forma de obtención de las giberelinas**

Existen diversos métodos de obtención de giberelinas, destacando entre los principales métodos de obtención los siguientes: síntesis química, extracción de plantas y producción por microorganismos, siendo esta última la más utilizada debido a que el costo beneficio es mucho mayor comparada contra los otros dos métodos de obtención, debido a lo siguiente:

### **1. Síntesis química**

Una completa síntesis química estereoespecífica de GA<sub>3</sub> fue reportada por Corey y col., (1978), utilizando 2-aliloxianisol como sustrato. Una síntesis regresiva fue seguida involucrando un número de pasos, de los cuales varió el rendimiento. Utilizando otra ruta, un intermediario tricíclico fue obtenido del material inicial, 4-benciloxi-ciclohexano. Esta ruta fue reportada por ser similar al método anterior. El resultado de la síntesis simple de intermediarios claves fue también reportado por Corey y Munroe (1982). Además, la síntesis total de GA<sub>3</sub> por la ruta de un hidrofluoreno fue reportado por Hook y col., (1980).

Aunque la síntesis química estereoespecífica de GA<sub>3</sub> es posible, involucra una serie de pasos y reactivos muy costosos. Por lo tanto, la producción de GA<sub>3</sub> mediante síntesis química no está destinada para su uso en la agricultura en ninguna parte del mundo. De hecho, la atención que se le ha dado a la síntesis química de GA<sub>3</sub> es sólo para fines académicos y de investigación (Kumar y Lonsane, 1989).

### **2. Extracción de plantas**

Se sabe que sólo cerca de la tercera parte de las giberelinas que se encuentran principalmente en plantas son fisiológicamente activas. La giberelina que se encuentra en mayor cantidad y con mayor actividad biológica es el GA<sub>3</sub>. Los tejidos de las plantas contienen alrededor de solo 0.001 a 1 mg de GA<sub>3</sub> por kilogramo de peso fresco (Brückner y Blechschmidt, 1991). Las

giberelinas están presentes en plantas superiores mayormente en forma ligada, junto con una pequeña cantidad de giberelinas libres. Las giberelinas ligadas poseen una carga neutra o son altamente más polares que las giberelinas libres. El procedimiento seguido para la extracción de giberelinas, es una maceración de los tejidos de la planta que involucra una extracción con metanol y una subsecuente partición de giberelinas libres en acetato de etilo a 2.5 unidades de pH. La fase acuosa sobrante contiene GA<sub>32</sub> y giberelinas ligadas. Lo último es purificado y dividido en una fase líquida-líquida. Es universalmente aceptado que la extracción de giberelinas de tejidos de plantas a escala comercial no es económicamente redituable debido a la escasa concentración de giberelinas presentes en las plantas (Kumar y Lonsane, 1989).

### **3. Cultivo microbiano**

El cultivo microbiano es en la industria, el método más utilizado para la producción de GA<sub>3</sub>. Alrededor de 1954, la ICI inició la producción comercial de GA<sub>3</sub> a nivel laboratorio utilizando *G. fujikuroi* con el fin de suministrar pequeñas cantidades de GA<sub>3</sub> a científicos alrededor el mundo y así probar sus efectos. En el presente, diferentes industrias producen GA<sub>3</sub> mediante cultivo microbiano en diversos países, como por ejemplo, Estados Unidos, Inglaterra, Hungría, Polonia y Japón (Kumar y Lonsane, 1989). La técnica de cultivo sumergido es por excelencia utilizada para la producción de giberelinas, a pesar de que fue de las primeras en utilizarse sigue siendo hasta la fecha la que produce mayores rendimientos.

Es interesante conocer los cambios en los objetivos de investigación sobre las giberelinas en países como India. Hasta 1970, el trabajo en India sobre las giberelinas estaba mayormente enfocado al aislamiento e identificación del hongo provenientes de plantas enfermas de "*Bakanae*". Fue hasta finales de los 70s que se hicieron esfuerzos notables para desarrollar tecnología para la producción masiva de giberelinas mediante cultivo

microbiano. La producción de GAs por cultivo sumergido fue iniciada en la universidad de Saugar, India, en 1976. Por ese año se utilizaba *Botryodiplodia theobromae*, la cepa seleccionada por su habilidad para dar el mayor rendimiento de GA<sub>3</sub> (conocida en ese momento y en ese lugar), dando un rendimiento de 0.31 y 0.50 g de GA<sub>3</sub> por litro en matraz agitado y biorreactor, respectivamente (Kumar y Lonsane, 1989).

#### **H. Proceso de cultivo microbiano**

Es el proceso mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. El microorganismo crece durante el transcurso del proceso, al mismo tiempo que el medio se va modificando y forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas (Ertola y col., 1994). En general, para cualquier proceso de cultivo microbiano, se puede describir la siguiente relación estequiométrica:

$$\text{Fuente de C} + \text{Fuente de N}_2 + \text{O}_2 + \text{Fosfatos} + \text{Minerales} \rightarrow \text{Biomasa} + \text{Productos} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Calor}$$

Durante el bioproceso del cultivo microbiano es recomendable cubrir los siguientes aspectos: tener un microorganismo de características apropiadas para el proceso, proporcionar un medio de cultivo adecuado el cual debe contener los nutrientes esenciales en las proporciones apropiadas, controlar las condiciones fisicoquímicas necesarias del medio de cultivo durante el desarrollo del microorganismo.

#### **I. Cultivo sumergido**

En la industria, los metabolitos secundarios son producidos en su mayoría bajo condiciones sumergidas, principalmente porque el escalamiento de procesos de cultivos sumergidos es más simple. En cultivo sumergido, el medio líquido es empleado en recipientes con gran profundidad con una

proporción de diámetro-altura 1:2 a 1:3. En la mayoría de los casos, todos los nutrientes están disueltos en agua excepto por aquellos cultivos en los que se involucran sólidos insolubles o líquidos inmiscibles en agua. El proceso de cultivo sumergido confiere numerosas ventajas: reduce los requerimientos de espacio, presenta mayor fiabilidad en el patrón de inoculación y de crecimiento, aumenta el control en la contaminación, y precisión en los parámetros de control, tales como pH, temperatura, aireación, condiciones nutricionales, entre otros, comparado con otros tipos de cultivos (Robinson y col., 2001).

El proceso de cultivo sumergido se lleva a cabo en matraces agitados o aireados, y biorreactores equipados con control de parámetros del proceso (Kumar y Lonsane, 1989).

En la actualidad, el GA<sub>3</sub> producido vía cultivo microbiano se genera principalmente en cultivo sumergido, no obstante, también han sido reportadas otras técnicas de producción como el cultivo en estado sólido o con micelio inmovilizado (Chavez-Parga y col., 2007).

#### **J. Microorganismo productor**

Debido a que el éxito o fracaso de un proceso de cultivo comienza con el microorganismo empleado, la selección del mismo es una decisión muy importante, en la cual se deben tener en cuenta ciertos criterios generales, los cuales se indican a continuación (Ertola y col., 1995):

- La cepa a utilizar debe ser genéticamente estable.
- Su velocidad de crecimiento debe ser alta.
- La cepa debe estar libre de contaminación, incluidos fagos.
- Sus requerimientos nutricionales deben ser satisfechos a partir de medios de cultivo de bajo costo.
- Debe ser de fácil conservación por largos periodos de tiempo, sin pérdida de sus características particulares.

- Llevar a cabo el proceso de cultivo completo en un tiempo corto.
- Si el objetivo del proceso es un producto, éste debe ser de alto rendimiento y de fácil extracción del medio de cultivo.

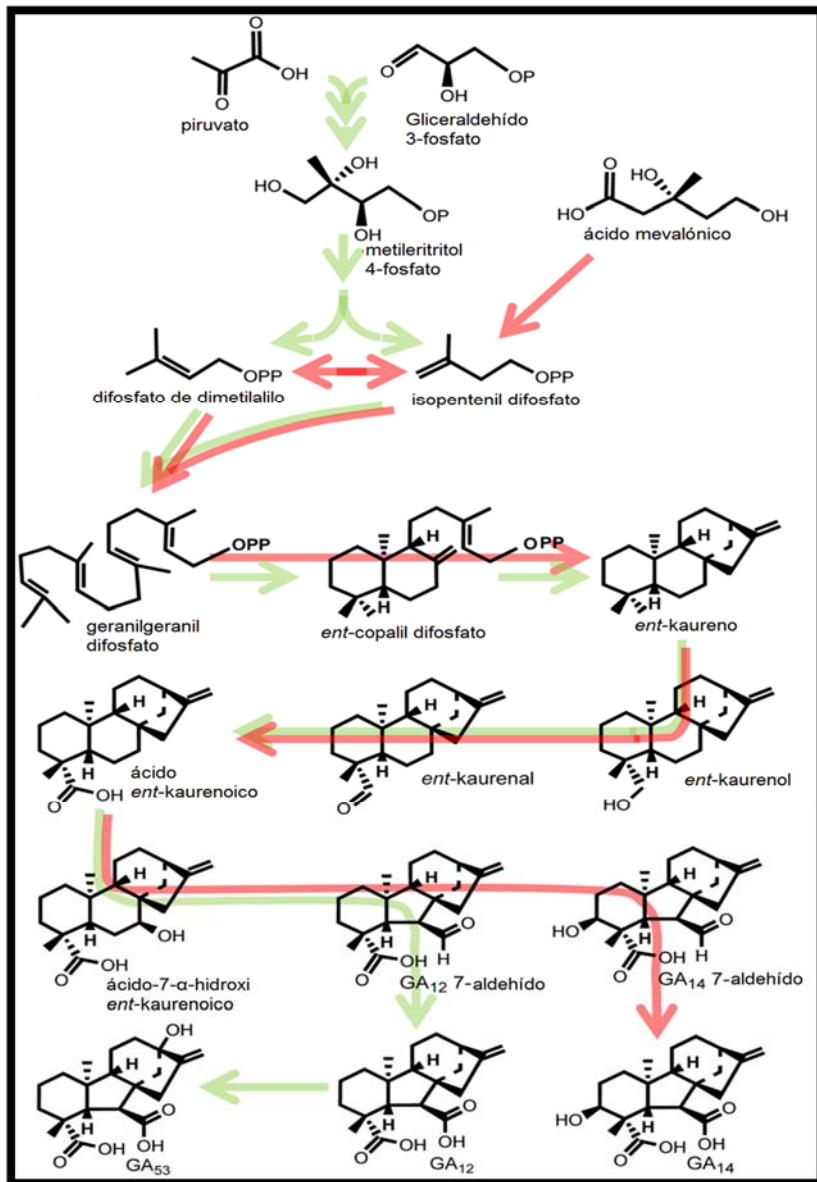
Escamilla Silva y col., en 1999 trabajaron con diversas cepas del hongo *G. fujikuroi* para la producción de GA<sub>3</sub>, y encontraron que la cepa H-984 alcanza una alta producción de la fitohormona. Dicha cepa fue empleada en este trabajo de investigación.

### 1. *Gibberella fujikuroi*

Muchos años de investigación con *G. fujikuroi* han dado una visión relativamente clara del metabolismo de GAs en este microorganismo. Las ventajas de trabajar con este hongo son:

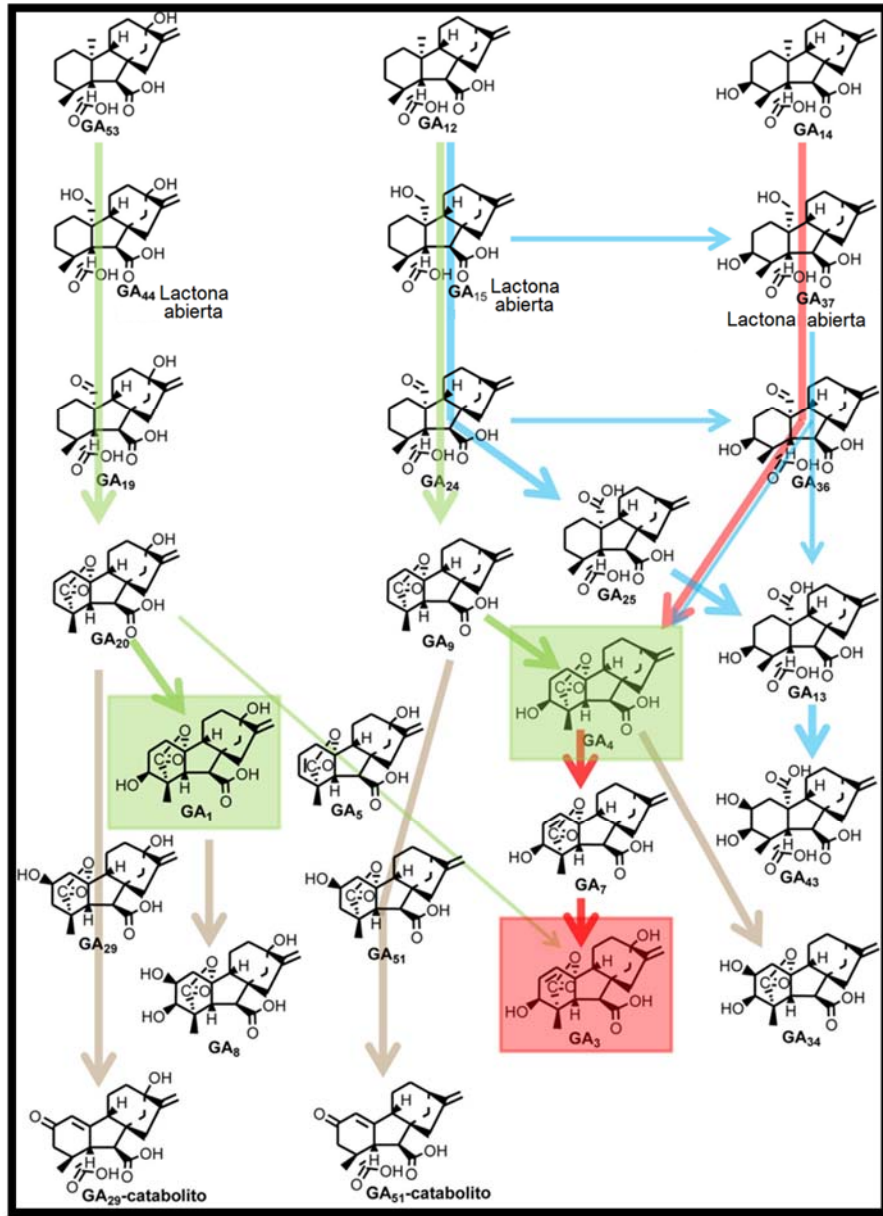
- Es de fácil cultivo.
- Fácil análisis de GAs y productos intermediarios, debido a las altas concentraciones que los produce.
- Alta eficacia de incorporación de los intermediarios radiomarcados en GAs.
- Fácil administración de inhibidores metabólicos.
- Disponibilidad de mutantes bloqueados en etapas distintas en la secuencia biosintética.

En retrospectiva, debe ser reconocido como una ventaja adicional que el metabolismo de GAs en *G. fujikuroi* es muy similar a la que ocurre en plantas superiores. La secuencia biosintética y las enzimas que participan son en gran medida comparables, aunque hay claras diferencias que no deben ser pasadas por alto (Rademacher, 1994) (**Figuras 4 y 5**).



**Figura 4.** Primeros pasos e intermedios de la biosíntesis de GAs en plantas superiores (flechas verdes) y del hongo *Fusarium fujikuroi* (flechas rojas). En plantas, *ent*-kaureno es sintetizado en los plástidos, predominando principalmente la vía del metileritritol fosfato, mientras que en el hongo, es sintetizado a partir del ácido mevalónico. El *ent*-kaureno se convierte a GA<sub>12</sub> y GA<sub>53</sub> (en plantas) y GA<sub>14</sub> (en hongos) y es catalizado por el citocromo P450 monooxigenasa que se encuentra asociado a la membrana. Las flechas que atraviesan las estructuras indican múltiples pasos catalizados por enzimas individuales (Hedden y Sponsel, 2015).





**Figura 5.** Últimos pasos en la biosíntesis de GAs, en tejidos de plantas (flechas verdes y cafés), endospermo de calabaza (flechas azules) y el hongo *Fusarium fujikuroi* (flechas rojas). Las principales GAs bioactivas en plantas, GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>, están en los cuadros verdes, mientras que la que se produce por medio del hongo, GA<sub>3</sub>, la cual también es la más bioactiva y producida en menor cantidad por algunas plantas, está en el cuadro rojo. (Hedden y Sponsel, 2015).

## **2. Fases de crecimiento de *Gibberella fujikuroi***

El cultivo microbiano para la producción de giberelinas es un ejemplo clásico de la producción de metabolitos secundarios. Las fases de crecimiento pueden distinguirse claramente en relación con estados nutricionales y ambientales que operan en el biorreactor (Monteiro-Machado y Soccol, 2007).

### **a. Fase lag**

Durante esta fase el hongo se adapta a las condiciones de crecimiento, así mismo, se produce la síntesis de ARN, enzimas y otras moléculas, por lo que en esta fase los microorganismos no están latentes. La fase lag 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 las células miceliales con crecimiento vigoroso como inóculo.

### **b. Fase exponencial**

El crecimiento durante esta fase es inicialmente exponencial y posteriormente, se convierte en lineal (Kumar y Lonsane, 1989). El consumo de glucosa, nitrógeno y otros nutrientes se mantiene casi constante por unidad de incremento en peso seco. Esta fase se extiende hasta que se produce el agotamiento de uno de los nutrientes, lo cual ocasiona que las células comiencen una etapa de desaceleración (en esta fase no hay producción de GAs).

### **c. Fase 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. En esta fase se da la producción de ácido giberélico y se alcanza su valor máximo de producción.

#### **d. Fase terminal**

Las células de micelio se someten a procesos de apoptosis debido a que no hay disponibilidad de fuentes de carbono utilizables. En la industria de Bioprocesos se evita llegar a esta fase de cultivo.

#### **K. Metabolismo secundario microbiano**

El metabolismo secundario de los microorganismos implica una serie de procesos sintéticos cuyos productos finales, no juegan un papel evidente en el aporte de energía del organismo. Clásicamente la producción de metabolitos secundarios exhibe un proceso de dos etapas (Appleyard y col., 1995), la primera conocida como trofofase (o fase de crecimiento) y la segunda llamada idiofase (o fase de producción), la cual se presenta cuando la velocidad de crecimiento ha disminuido o cesado (Marwick y col., 1999). Dependiendo de las condiciones del entorno los microorganismos pueden producir metabolitos secundarios, incrementando la disponibilidad de nutrientes (por ejemplo, en forma de agentes quelantes como los sideróforos), protegiéndose contra el estrés ambiental (por ejemplo, produciendo pigmentos que los protejan de la irradiación UV), mejorando sus interacciones competitivas por los nutrientes con otros microorganismos en los nichos ecológicos, disminuyendo el estado físico de sus huéspedes (por ejemplo: plantas, animales o humanos), o actuando como un mecanismo de defensa metabólica (Tudzynski, 2014).

Los hongos poseen un mecanismo para la regulación del metabolismo y el control de la biosíntesis de metabolitos secundarios a fin de garantizar que la energía y precursores químicos sean únicamente utilizados en ambientes donde la producción de metabolitos sea conveniente (Takahashi y col., 2013).

Las giberelinas son un grupo importante de metabolitos secundarios, siendo fitohormonas de crecimiento las cuales pueden existir tanto en plantas superiores como en ciertos hongos filamentosos como *G. fujikuroi* (Appleyard y col., 1995).

## **L. Observaciones generales en la expresión de los metabolitos de hongos**

Se han utilizado dos enfoques principales en el descubrimiento y producción de nuevos metabolitos secundarios bioactivos, de los cuales los principales objetivos son el incremento en el rendimiento y el mejoramiento de la diversidad química mediante la producción de nuevos metabolitos. El primer enfoque concierne al aislamiento de hongos de diferentes biomas (ambientes tropicales, desiertos, áreas glaciales, etcétera), o de nuevas fuentes (endófitas, endoliquénicos, etcétera), dirigidas al aislamiento de nuevas especies útiles (Takahashi y col., 2013).

El segundo enfoque se basa en la manipulación de las condiciones de cultivo con el propósito de controlar las rutas biosintéticas, dando que la producción de metabolitos secundarios dependa directamente de las condiciones de cultivo bajo las cuales el hongo este creciendo. La manipulación nutricional, la simulación del ambiente nativo mediante la adición de componentes químicos, así como son los cambios en la temperatura, pH, luminosidad y consumo de oxígeno se han realizado tradicionalmente sin considerar la secuenciación genética de las especies estudiadas (Takahashi y col., 2013).

## **M. Biorreactor**

El biorreactor es el equipo medular de la microbiología industrial. Es el recipiente donde se realiza el cultivo, y su diseño debe ser tal que asegure un ambiente homogéneo y adecuado para los microorganismos. Entre las tareas que realiza el biorreactor están:

- a) Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación.
- b) Mantener constante y homogénea la temperatura.
- c) Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes.

- d) Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo del mismo.
- e) El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente inoculado con el microorganismo deseado.

Para satisfacer los cuatro primeros puntos es necesario que el biorreactor esté provisto de un sistema de agitación, además se requiere de un sistema de inyección aire en el cultivo.

Debido a su simple construcción y características económicas de mezclado, los biorreactores tipo *airlift* fueron empleados inicialmente en aplicaciones industriales donde se requiere alta transferencia de masa y un buen mezclado, principalmente en los procesos de cultivo microbiano a gran escala. Sin embargo, el reactor *airlift* es lo suficiente versátil para promover su uso en un gran número de aplicaciones como por ejemplo: la producción de metabolitos secundarios como bikaverinas y giberelinas (Chávez-Parga y col., 2008). Debido a que el mezclado se realiza través de la expansión de gas inyectado, este tipo de equipos suelen ser muy útiles en los cultivos donde el microorganismo es muy frágil. Diversos investigadores han utilizado reactores *airlift* para aplicaciones donde el medio de cultivo presenta características de líquido no newtoniano, como es el caso de las fermentaciones con hongos filamentosos (Young y col., 1991).

En los reactores tipo *airlift* (**Figura 6**) es el mismo aire inyectado al cultivo lo que promueve la agitación. Básicamente consiste en dos cilindros concéntricos y por la base de uno de ellos, se inyecta aire. De este modo se genera una circulación de líquido ascendente en el compartimiento interno y descendente en el externo, lo que favorece el mezclado. La zona donde se esparce el aire (interior del tubo ascendente) tiene una mayor retención de gas que la zona relativamente libre de aire, donde el flujo desciende (Drandev y col., 2016). Se

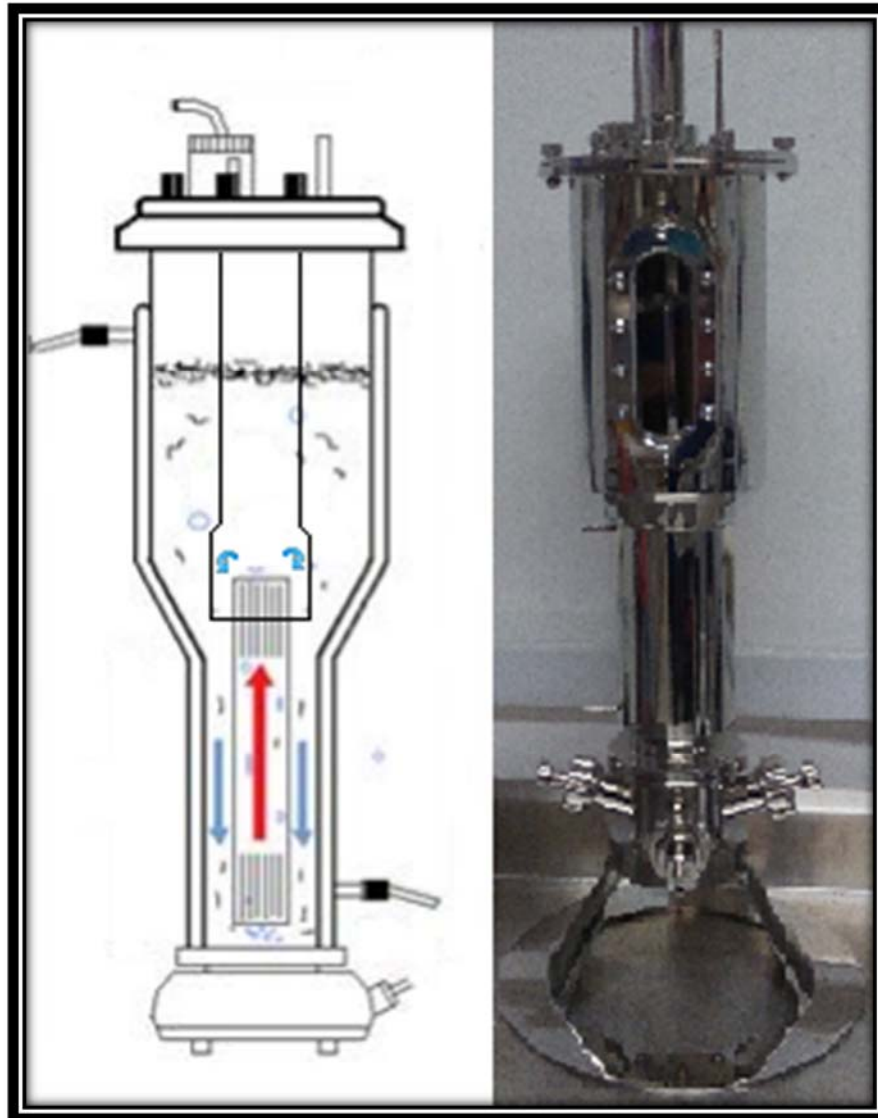


Figura 6. Esquema general de un biorreactor *airlift*.

sabe que el uso de este tipo de biorreactores es una técnica viable y económica, su uso se ha extendido a procesos de cultivo microbiano donde la presencia de oxígeno es indispensable, como en el tratamiento de aguas residuales. Entre las ventajas que ofrece esta configuración de biorreactor se encuentra: la simplicidad que tiene su diseño y construcción, bajo consumo de energía, esfuerzo de corte bajo o nulo, buen mezclado y extiende la operación aséptica, debido a que no tiene eje agitador ni placas deflectoras, son ventajas importantes del biorreactor *airlift* en la aplicación del cultivo (Chavez-Parga y col., 2007).

Existen dos tipos principales de biorreactores: tanque agitado y *airlift*. En el **Cuadro 2**, se muestran las ventajas y desventajas que presentan los reactores mencionados anteriormente (Lee, 1992).

#### **N. Modificaciones del medio de cultivo**

Los hongos son organismos heterótrofos y por lo tanto requieren una variedad de nutrientes orgánicos para llevar a cabo todas sus funciones biológicas, siendo los carbohidratos su mejor fuente de energía. Sin embargo, se han utilizado otras fuentes de carbono menos comunes, tal es el caso de *G. fujikuroi* en donde se ha demostrado una mayor producción al utilizar glucosa y aceite de maíz en un experimento para producir ácido giberélico (Takahashi y col., 2013). Todos los medios propuestos que garantizan altos rendimientos en la producción de giberelinas tienen bajas concentraciones de nitrógeno en su composición. El crecimiento bajo condiciones limitadas de nitrógeno es necesario para inducir una mayor concentración de GA<sub>3</sub> debido a que su formación es la de un metabolito secundario típico el cual requiere de un crecimiento desequilibrado (Rios-Irbe y col., 2013).

El agotamiento del nitrógeno no solo influye en la producción de GA<sub>3</sub>, también afecta el crecimiento y el metabolismo del sustrato (Rios-Irbe y col., 2013). Existen algunos estudios relacionados al crecimiento de *Geotrichum*

**Cuadro 2.** Características de biorreactores *airlift* y tanque agitado.

<b>Biorreactor</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Tanque agitado	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Flexible y adaptable</li> <li>2. Amplia variedad para velocidades de mezclado.</li> <li>3. Capacidad para manejar medios de alta viscosidad.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Gran consumo de potencia</li> <li>2. Daño de células debido a los esfuerzos de corte</li> <li>3. Alto costo de equipamiento</li> </ol>
<i>Airlift</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. No presenta partes en movimiento.</li> <li>2. Alta eficiencia en la absorción de gases</li> <li>3. Excelente transferencia de calor.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Menor eficiencia en el mezclado, cuando se usan caldos con alta viscosidad</li> <li>2. No recomendable para sistemas con alta viscosidad</li> <li>3. Excesiva generación de espuma</li> </ol>

---

Lee, (1992)



*candidum* y *Penicillium camembertii* utilizando glucosa y amonio como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente. En este caso se observó una acidificación del medio, lo cual fue atribuido al intercambio  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$  (Amrane y col., 2003).

## **1. Macronutrientes**

Para el cultivo de microorganismos se requieren nutrientes en grandes cantidades ya que estos son esenciales para el crecimiento y mantenimiento celular del mismo. Un ejemplo de esto es la fuente de carbono (glucosa, glicerol, sacarosa, aceites naturales, metanol) y la fuente de nitrógeno (sulfato de amonio, cloruro de amonio, glutamina y tartrato de amonio).

### **a. Fuente de nitrógeno**

La fuente de nitrógeno es un factor importante en la producción de metabolitos secundarios. Los microorganismos son capaces de utilizar una amplia cantidad de moléculas orgánicas e inorgánicas, así como mezclas complejas, como lo son las peptonas, levaduras, maíz, y extractos de soya, como una fuente de nitrógeno en la etapa de crecimiento y la producción de metabolitos secundarios (Takahashi y col., 2013).

De todos los factores ambientales, la calidad y la cantidad de la fuente de nitrógeno utilizada en el medio de cultivo, presenta un efecto especial no solo en el crecimiento, sino también en la biosíntesis de muchos metabolitos secundarios provenientes de hongos, por ejemplo la producción de giberelinas, bikaverina, ácido fusárico y fusarina en *Fusarium fujikuroi* (Tudzynski, 2014).

Recientes experimentos del genoma completo en microarreglos bajo condiciones de nitrógeno limitante y no limitante en *Fusarium fujikuroi* revelaron la expresión de 30 de 45 clúster de genes aceptados y asociados al metabolismo secundario, esta expresión depende de la cantidad y calidad de la fuente de nitrógeno, y se sabe que al menos dos de estos genes están

relacionados con la producción de diterpenos (grupos de giberelinas y carotenoides) (Tudzynski, 2014).

Los hongos filamentosos son capaces de utilizar muchos compuestos químicos como única fuente de nitrógeno, pero utiliza preferentemente aquellas fuentes de nitrógeno que sean energéticamente favorables como el  $\text{NH}_4^+$  y la glutamina mientras que estén presentes en el medio. En ausencia de estas fuentes también pueden ser utilizadas otras fuentes de nitrógeno menos asimilables como nitrato, urea, ácido úrico, aminas, amidas, purinas y pirimidinas. El mecanismo de regulación que permite la utilización preferencial de las fuentes de nitrógeno de fácil asimilación en una circunstancia, pero la utilización selectiva de las fuentes de nitrógeno secundarias en otra circunstancia, se le llama represión catabólica por nitrógeno (Tudzynski, 2014).

## **b. Fuente de carbono**

Frecuentemente la glucosa y la sacarosa son utilizadas como fuente de carbono, pero se debe evitar la utilización de altas concentraciones de glucosa (> 20 %) al inicio del cultivo con el fin de evitar la regulación de la fuente de carbono. Existe la propuesta de utilizar fuentes mixtas de carbono en donde se emplea al menos una fuente de carbono que sea de rápido consumo y que cumpla la función de satisfacer los requerimientos de energía del metabolismo primario (por ejemplo glucosa), y otra de consumo lento que puede ser empleada para la biosíntesis de idiolitos (Brückner y Blechschmidt, 1991). Muchos estudios han utilizado fuentes de carbono alternativas, tales como maltosa, manitol (Candau y col., 1991), y estudios más recientes, Rios-Irbe y col., en el 2013 tuvieron éxito en la producción de giberelinas con el empleo de una fuente mixta de carbono (glucosa-aceite de maíz).

### **1) Fuente de carbono mixta**

El hongo *G. fujikuroi* es el único microorganismo capaz de excretar ácido giberélico en cantidades industriales. Por tal motivo se han empleado nuevas

estrategias para incrementar su producción, el mejoramiento genético de la cepa, modificación de las condiciones de cultivo, el uso de fuentes mixtas de carbono, son ejemplos de las estrategias empleadas para la mejora de la producción de GA<sub>3</sub>. Diversas investigaciones, prueban que la elección de la fuente de carbono durante los procesos de cultivo microbiano para la producción de metabolitos, incide directamente en su rendimiento. En la actualidad, hay escasos reportes científicos de producción de GA<sub>3</sub> usando fuentes de carbono mixtas mediante *G. fujikuroi*.

Darken y col. (1959) probaron distintas fuentes de carbono y demostraron que el tipo y la cantidad de la fuente de carbono influyen directamente en la producción de ácido giberélico. Además demostraron que el uso de fuente mixtas de carbono es una estrategia eficaz para incrementar la producción de ácido giberélico ya que obtuvieron una producción máxima de 0.8 g L<sup>-1</sup> al utilizar una fuente mixta de carbono (glicerol, glucosa y lactosa) y una producción de 0.65 g L<sup>-1</sup> en biorreactor al utilizar almidón y glicerol como fuente de carbono, mientras que al utilizar sólo una fuente de carbono (almidón) obtuvieron una producción de 0.4 y 0.38 g L<sup>-1</sup> a nivel matraz y biorreactor, respectivamente, lo que corrobora que el uso de fuentes mixtas de carbono es una herramienta que se debe considerar para la producción de GA<sub>3</sub>.

Recientemente, Rios-Irribé y col., en el 2011 reportaron el efecto que genera utilizar una combinación de dos fuentes de carbono (glucosa y aceite de maíz) en diferentes proporciones (1:2, 1:1 y 2:1) con respecto a utilizarlas de manera individual. El resultado que obtuvieron fue que el uso de la combinación de la fuente de carbono obtuvo una mayor producción de ácido giberélico comparado con utilizar solo glucosa o aceite de maíz, y más aún, la proporción de la fuente mixta 1:2 obtuvo la mayor producción de GA<sub>3</sub> siendo de 0.43 g L<sup>-1</sup>. Lo anterior sugiere que la fuente mixta ejerce un efecto inductivo en el incremento en la producción de GA<sub>3</sub>, esto debido a que la disposición de una

fuentes de carbono de rápida asimilación ayuda a alcanzar la fase estacionaria en un menor tiempo, y se complementa con una fuente de carbono de lenta asimilación la cual evita la represión catabólica de la fuente de carbono en el microorganismo, haciendo que consuma sólo lo necesario para la subsistencia de éste, generando un estado de estrés lo cual favorece la producción de metabolitos secundarios que los utiliza como mecanismos de supervivencia los cuales son ampliamente deseables como en este caso es la producción de la fitohormona GA<sub>3</sub>. Entre otras investigaciones reportadas utilizando fuentes mixtas para la producción de GAs destacan: la utilización de glucosa y harina de arroz (Escamilla-Silva y col., 2000; Shukla y col.; 2005).

### **c. Otros Macronutrientes**

Los requerimientos de otros macronutrientes como el P y el S son suministrados en forma de HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup> y SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> (o aminoácidos azufrados). El fósforo se incorpora en la forma de ácidos nucleicos, y polímeros celulares. El S es asimilado para la síntesis de aminoácidos azufrados, y además se necesita para la biotina, coenzima A, tiamina y otros componentes.

Los requerimientos de K y Mg son también esenciales. Una parte importante del potasio está unida al RNA de manera que los requerimientos de potasio aumentan con los factores que influyen en el aumento del RNA de las células, como la velocidad de crecimiento. El ión K<sup>+</sup> actúa como coenzima y probablemente actúa como catión en la estructura aniónica de varios componentes celulares. El ion Mg<sup>+2</sup> es esencial para la estabilidad de los ribosomas y actúa como cofactor en numerosas reacciones del metabolismo. Tanto el K como el Mg se incorporan a los medios en forma de sales como fosfato y sulfato.

## **2. Micronutrientes**

Con respecto a los micronutrientes se distinguen 2 categorías: los que son frecuentemente esenciales para el crecimiento como Ca, Mn, Fe, Co, Cu y

Zn y los que raramente son esenciales como B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, Sn, e I (Ertola y col., 1994).

A pesar del pronunciado efecto que tienen los minerales y los elementos traza en la biosíntesis de metabolitos secundarios, poca información existe sobre estos aspectos en la producción de GAs (Kumar y Lonsane, 1989).

Elementos traza como el Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, B, Al y Ca son requeridos en cultivo microbiano para la producción de GAs. Estos son usualmente añadidos en excesos o en combinaciones. Algunos resultados importantes en el estudio sobre los efectos que tienen los elementos traza en la producción de GAs incluyen: (1) la producción de GA<sub>4</sub> por *G. fujikuroi* NRRL 2633 fue incrementada notablemente por la adición de Al, Zn, y Cu; (2) molibdato de sodio a niveles de 0.1-1 mg L<sup>-1</sup> o CaCO<sub>3</sub> concentraciones de 7 g L<sup>-1</sup> disminuyen la producción de GA<sub>3</sub> (Kumar y Lonsane, 1989).

### **3. Condiciones fisicoquímicas de cultivo necesarias**

El pH del medio de cultivo es una condición clave para generar la diversificación metabólica, dado que, junto con la temperatura, el pH también está directamente involucrado en la activación y desactivación enzimática. Juntos, actúan ampliando o limitando el número de enzimas activas en la producción de metabolitos secundarios. Otras condiciones físicas, como la disponibilidad de luz, son también obligatorias en la activación de funciones bioquímicas fisiológicas (Kumar y Lonsane, 1989; Takahashi y col., 2013).

#### **a. pH**

El pH de una solución es una medida de la concentración de iones H<sup>+</sup> presentes. Distintos valores en el pH durante el crecimiento pueden interpretarse en términos de efectos sobre el transporte de nutrientes, solubilidad de nutrientes, reacciones enzimáticas o fenómenos superficiales (Papagianni, 2004). Existen investigaciones donde se ha demostrado que el

crecimiento de hongos está linealmente correlacionado con las variaciones de pH, así, el crecimiento fúngico puede ser monitoreado realizando mediciones de pH durante el cultivo microbiano (Amrane y col., 2003).

#### **b. Temperatura**

Aunque la temperatura es un parámetro ambiental fácil de controlar, los cambios de temperatura producen cambios simultáneos en otras variables de cultivo. La tensión de oxígeno disuelto es dependiente de la temperatura y varía inversamente con el aumento de la misma. De manera similar, los requerimientos nutricionales y de pH para el crecimiento son influenciados por la temperatura (Papagianni, 2004).

El efecto de la temperatura sobre la producción de GA<sub>3</sub> depende de la cepa empleada. Se han estudiado diferentes condiciones de temperatura que oscilan entre los 25 y 34 °C. Estudios previos muestran que la temperatura óptima para el crecimiento de la cepa está entre 31 y 32 °C mientras que la producción de GA<sub>3</sub> alcanza su valor óptimo a los 29 °C (Monteiro-Machado y Soccol, 2007).

#### **c. Aireación**

La solubilidad del oxígeno en medio acuoso está aproximadamente en el rango de 8 a 10 mg L<sup>-1</sup> para un intervalo de temperatura de 25 a 30 °C a 1 atm de presión. Aunque el efecto de la aireación y agitación es pronunciado en la producción de GA<sub>3</sub> por el proceso de cultivo sumergido, no hay estudios cinéticos disponibles o que estén directamente relacionados al rango de producción de GA<sub>3</sub> (Ates y col., 2006). Es bien conocido que un continuo suministro de oxígeno es requerido para la producción de GA<sub>3</sub>, como la biosíntesis progresa a través de compuestos que incrementan los niveles de oxidación, debido a que existen pasos oxidativos en la síntesis de las GAs. Los rangos de aireación empleados por diferentes investigadores se encuentran de 0.25 ó 0.3-0.5 vvm. La velocidad de agitación empleada son de 100, 150, 350, o

1400 rpm. La interacción de diferentes rangos de aireación y agitación y los subsecuentes cambios en los procesos de oxigenación y transferencia de gas han sido reportados por algunos investigadores (Borrow y col., 1964). Estos cambios son causados principalmente por bajas concentraciones en el suministro de oxígeno o las condiciones causadas por las restricciones de oxígeno son (1) bajos rendimientos de compuestos acidificados, (2) desviación de las rutas metabólicas, (3) producción de un nuevo rango de componentes, (4) desarrollo de olores en el medio, (5) rendimientos sin cambios para nitrógeno constante, (6) comienzo de una fase de crecimiento linear, (7) bajo consumo de glucosa, (8) baja productividad, y (9) cambios en la producción de biomasa (Kumar y Lonsane, 1989).

#### **d. Luz**

Se ha encontrado que la luz tiene impacto significativo en la producción de giberelinas debido a la relación que existe entre la biosíntesis de estas con la de carotenoides. El incremento en la producción de carotenoides se ha visto acompañada por la disminución en la producción de giberelinas y viceversa. Garbayo y col. (2003) demostraron que la exposición del micelio a pulsos de luz blanca por periodos mayores a 8 minutos son necesarios para detectar la síntesis de carotenoides en *G. fujikuroi*.

#### **O. Modelo matemático**

Los modelos de crecimiento y producción metabólica basados en las características fisiológicas del micelio son importantes para comprender, diseñar y controlar los procesos de cultivo microbiano. En otras palabras, estos modelos nos permiten obtener información de manera práctica, facilitando el análisis del cultivo, y pueden ser utilizados para resolver problemas que pudieran aparecer durante el proceso de cultivo microbiano. Existen una gran variedad de modelos matemáticos para describir los fenómenos que pudieran ocurrir en cultivos tipo batch. En general, los modelos se emplean para describir

si el crecimiento está directamente relacionado o no con el consumo de sustrato y tienen dos o tres parámetros ajustables en los casos más simples (Chavez-Parga, 2005).



#### IV. JUSTIFICACIÓN

Desde el descubrimiento de las giberelinas, se han propuesto numerosas estrategias para incrementar su producción a través del cultivo de microorganismos, siendo el GA<sub>3</sub> el metabolito secundario de *G. fujikuroi* el de mayor importancia e impacto en el giro agroindustrial. Las diversas investigaciones sobre las GAs demuestran los diversos beneficios que estas hormonas ejercen sobre las fases de crecimiento de las plantas, desde la germinación hasta la senescencia. Más allá de demostrar solamente los usos y beneficios que ofrece la utilización de GAs en plantas, se han realizado diversos estudios con el fin de incrementar y optimizar su producción y sus rendimientos por medio del cultivo de *G. fujikuroi*. Se sabe que un factor indispensable para llevar a cabo un cultivo microbiano es la fuente de carbono, siendo la glucosa el sustrato más ampliamente utilizado debido a que es el compuesto iniciador en la ruta de la glucólisis, siendo así un sustrato de rápida asimilación. En estudios recientes sobre producción de metabolitos vía cultivo microbiano se ha propuesto la utilización de glicerol como fuente de carbono debido a que es un sustrato de lenta asimilación para los microorganismos, el cual induce reacciones de reducción y su metabolismo requiere menos oxígeno comparado con el de otros sustratos como el aceite, además, es un subproducto de la producción de biodiésel, lo que hace que sea una fuente de carbono sustentable para el cultivo de microorganismos. Por lo anterior, se ha planteado una nueva estrategia de cultivo basada en el empleo de una fuente mixta de carbono, glucosa-glicerol, para aumentar la producción de GA<sub>3</sub>, a partir del hongo *G. fujikuroi* en un biorreactor *airlift*, lo cual podría ser una alternativa sustentable para incrementar la producción de esta fitohormona.

## **V. HIPÓTESIS**

La utilización de una fuente de carbono mixta, glucosa glicerol, incrementa la producción de ácido giberélico a partir de *Gibberella fujikuroi*, con respecto a utilizar glucosa o glicerol como única fuente de carbono.

## VI. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

Analizar el efecto de la fuente de carbono mixta glucosa glicerol en la producción de ácido giberélico a partir de *Gibberella fujikuroi* en un sistema de cultivo sumergido por lotes, utilizando un biorreactor *airlift*.

### B. Objetivos específicos

1. Estudiar las cinéticas de consumo de nutrientes y producción de biomasa y GA<sub>3</sub> utilizando una fuente de carbono mixta y utilizando glucosa o glicerol como única fuente de carbono.
2. Comparar la producción de GA<sub>3</sub> para la fuente de carbono mixta, con la obtenida en el cultivo microbiano utilizando glucosa o glicerol como única fuente de carbono y validar estadísticamente las diferencias.
3. Modelar e interpretar mediante un análisis computacional de datos por ajuste, los parámetros cinéticos de consumo de nutrientes y producción de biomasa.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. MATERIALES

#### 1. Material biológico

Se utilizó la cepa *Gibberella fujikuroi* CDBB H-984, obtenida de la Colección Nacional de Cultivos Microbianos del CINVESTAV-IPN, México, la cual fue proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Celaya. El hongo fue conservado en tubo inclinado con medio sólido de agar papa dextrosa (PDA) a 4°C y se resembró cada dos meses.

### B. MÉTODOS

#### 1. Preparación de los medios de cultivo

Medio PDA. Se picaron finamente 75 g de papa sin cascara, la cual se colocó en 200 mL de agua destilada en ebullición por un periodo de 20 minutos para su cocción. Una vez cocida la papa, se filtró haciéndola pasar por manta cielo doblada 2 veces con sucesivos lavados con agua destilada hasta que el filtrado alcanzó un volumen de 250 mL en una probeta. El filtrado se colocó en un matraz de 500 mL y se le agregó paulatinamente 3.75 g de agar bacteriológico comercial (BD) para evitar la formación de grumos. Una vez disuelto el agar, se dejó en ebullición durante 1 minuto. Transcurrido el tiempo se le añadieron 5 g de glucosa hasta disolverse totalmente. El medio se distribuyó en cantidades de 5 mL en tubos de ensayo con tapa rosca de 10 mL de capacidad.

Medio de propagación. En 500 mL de agua destilada se disolvieron y aforaron los siguientes componentes: 10 g de glucosa, 1.5 g de extracto de levadura, 1.25 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.25 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.5 g de  $\text{CaCO}_3$ . Este medio de cultivo empleado para la preparación del inóculo fue reportado por Escamilla y col. (2000).

Medio de producción. Se utilizó la fuente de carbono mixta (glucosa-glicerol), en base a 40 g L<sup>-1</sup> de C total. La proporción glucosa-glicerol que se utilizó fue una proporción 1:2, 13.3 g L<sup>-1</sup> C glucosa (33.25 g L<sup>-1</sup>): 26.7 g L<sup>-1</sup> C glicerol (68.2 g L<sup>-1</sup>). Además se realizaron los experimentos utilizando glucosa como única fuente de carbono (100 g L<sup>-1</sup>) y glicerol como única fuente de carbono (102.2 g L<sup>-1</sup>). Como medio basal se utilizó 1.5 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl, 2 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O y 2 mL L<sup>-1</sup> de una solución de oligoelementos. La solución de oligoelementos está compuesta por los siguientes compuestos en: 1 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 1.5 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0.2 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O y 1 g L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O. Todos los medios anteriores se esterilizaron en autoclave a 15 psig de presión durante 15 minutos.

## 2. Condiciones de cultivo

El micelio desarrollado en un tubo inclinado con PDA se removió utilizando 5 mL de una solución isotónica de NaCl al 0.9 % y la suspensión resultante se homogenizó. El inóculo utilizado en los experimentos en el biorreactor se preparó en un matraz Erlenmeyer de vidrio de 500 mL de capacidad conteniendo 2 mL de la suspensión y 250 mL de medio de propagación. El hongo se cultivó durante 38 h a 29°C y 280 rpm. La incubación se realizó en una agitadora con control automático de agitación (STIK). Para los experimentos se utilizó un biorreactor *airlift* (Applikon, de 5 L de capacidad), equipado con sensores de pH, temperatura y oxígeno disuelto **Figura 7**, para monitorear y controlar dichas variables. Además, el biorreactor cuenta con dos bombas peristálticas las cuales se emplearon para la adición de soluciones amortiguadoras (necesarias para el control del pH) y de agua destilada estéril. Cabe resaltar que en todos los experimentos las condiciones de cultivo fueron las mismas. Cada componente del medio de producción se esterilizó por separado en recipientes de vidrio con tapa rosca. El biorreactor y todas las mangueras necesarias para su funcionamiento fueron también esterilizadas; una vez estéril el biorreactor y a temperatura ambiente del laboratorio se



**Figura 7.** Biorreactor tipo *airlift* utilizado para los experimentos de este proyecto de investigación.

procedió a cargar el medio de cultivo. Ya homogéneo el medio y controladas la temperatura a 29°C y el pH a 3.5, se procedió con la inoculación. El medio de cultivo de 4300 mL contenido en el biorreactor, fue alimentado con 225 mL de inóculo, esto es en una relación del 5% inóculo respecto al medio de cultivo. Los procesos descritos anteriormente fueron realizados en condiciones estériles, para asegurar un cultivo puro de *Gibberella fujikuroi*.

### **3. Toma de muestra**

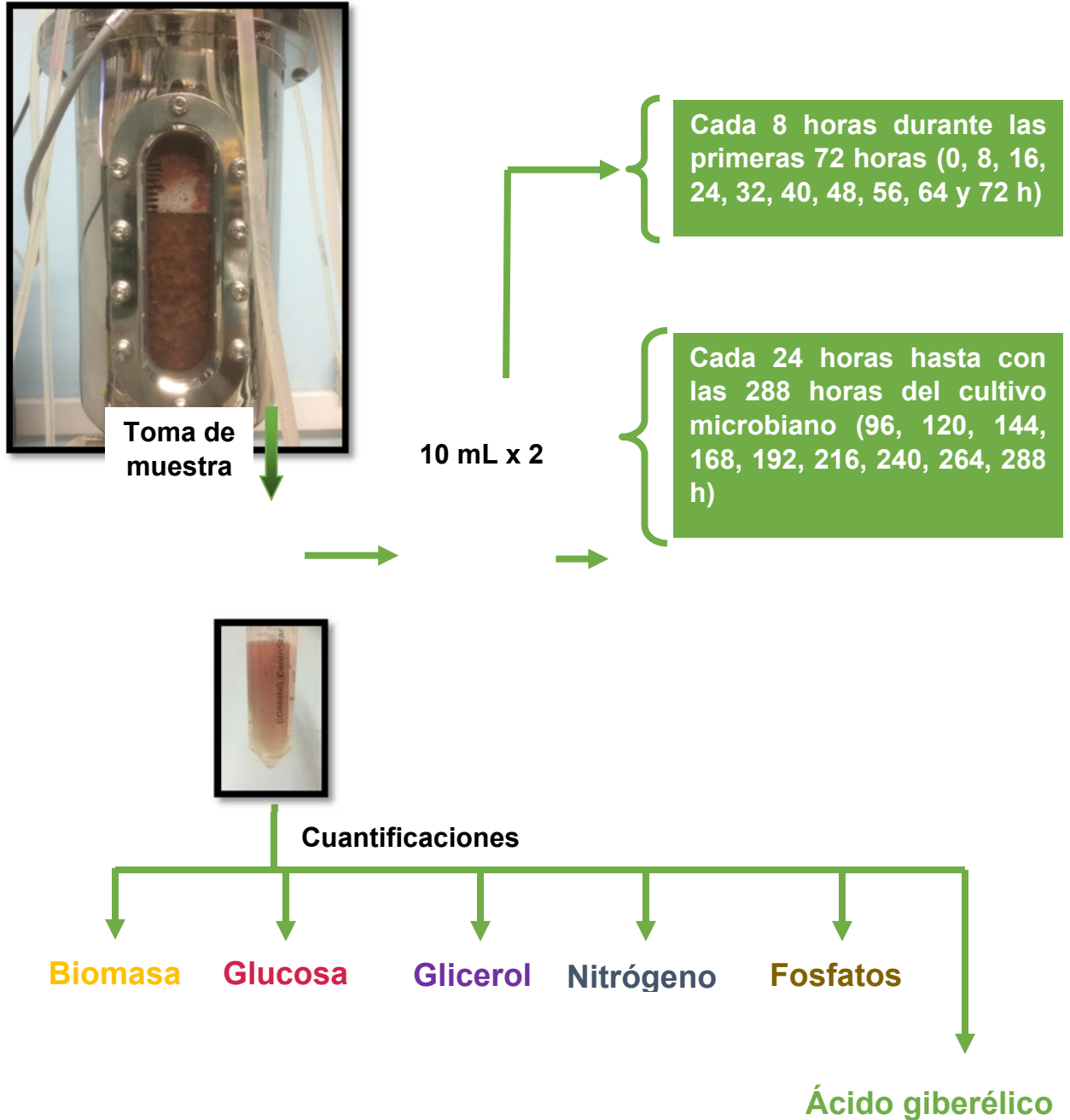
Durante cada uno de los experimentos (**Figura 8**) se procedió a retirar un volumen de muestra de 12.5 mL, en tubos graduados cónicos para centrifuga. Dichas muestras se tomaron a la hora inicial del cultivo y cada 8 h durante las primeras 72 h del cultivo, posteriormente el intervalo de muestreo se realizó cada 24 h hasta finalizar con las 288 h del cultivo microbiano. Cabe mencionar que en cada intervalo de 24 h del cultivo se retiró muestra por duplicado.

Inmediatamente después de realizar la toma de muestra se realizó su tratamiento y análisis correspondiente.

#### **a. Determinación de la biomasa**

La biomasa generada de *Gibberella fujikuroi* se determinó gravimétricamente. Inicialmente, se etiquetaron y pusieron a peso constante membranas Millipore de nitrocelulosa de 0.45 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro a una temperatura de 90°C durante 4 h. Posteriormente, se colocaron en un desecador por un periodo de 20 minutos y se registró el peso de las membranas libres de humedad ( $P_1$ ). La muestra se filtró reduciendo la presión con la ayuda de una bomba de vacío a través de la membrana; la membrana con la biomasa se secó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para el secado de la membrana; una vez seca la membrana con la biomasa se registró su peso ( $P_2$ ). El filtrado que se recuperó se conservó a 4°C para análisis posteriores.

## Cultivo microbiano



**Figura 8.** Esquema general de trabajo durante los experimentos realizados de cultivo microbiano.



Los cálculos del crecimiento del hongo se realizaron con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de Biomasa} = (P_2 - P_1) / V$$

Donde:

$P_1$  = Peso de la membrana (g)

$P_2$  = Peso de la membrana con la biomasa (g)

$V$  = Volumen de la muestra (L)

### **b. Cuantificación de glucosa**

La concentración de glucosa se determinó mediante la técnica del ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959), con el método colorimétrico usado para la cuantificación de azúcares reductores, utilizando un espectrofotómetro SPECTRONIC 200 a una longitud de onda de 575 nm.

Para cada muestra tomada del cultivo microbiano, se colocó en un tubo de reacción 1 mL de filtrado (haciendo la correspondiente dilución de ser necesario), se agregó 1.5 mL del reactivo de Miller (Apéndice A) e incubó durante 10 minutos en agua en ebullición. Pasado el tiempo de reacción, se sacaron inmediatamente los tubos del agua y se les añadió 1 mL de sal de Rochelle (Apéndice A). La reacción se detuvo por choque térmico al introducir los tubos en agua a punto de congelación; transcurridos 5 minutos se sacaron los tubos del agua y se les agregaron 2 mL de agua destilada. Una vez que la solución llegó a temperatura de laboratorio se procedió a leer su absorbancia a 575 nm. Para preparar el blanco se sustituyó el filtrado por agua destilada y fue tratado bajo las mismas condiciones de la muestra.

La concentración de glucosa se infirió con la ayuda de la curva de calibración realizada a las mismas condiciones de análisis usando concentraciones conocidas de glucosa (Apéndice B).

### **c. Cuantificación de glicerol**

El glicerol remanente en el medio de cultivo, se determinó por el método de condensación de Hantzsch (Foster y Dunn, 1973). Un método colorimétrico, en el cual, el glicerol es oxidado a formaldehído y posteriormente condensado con amoníaco y 2,4-pentadiona (acetilacetona) para producir un complejo amarillo, 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (condensación de Hantzsch). En un tubo de reacción, se agregó con una micropipeta 200  $\mu$ L de muestra filtrada, posteriormente se adicionó 1 mL de metaperyodato de sodio (Apéndice A) y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 2.5 mL de acetilacetona (Apéndice A). Inmediatamente después se agitó vigorosamente y se incubó la reacción durante 20 minutos a 50 °C. Posteriormente se detuvo la reacción colocando los tubos en agua fría. Una vez que los tubos alcanzaron la temperatura ambiente se procedió a leer la absorbancia a una longitud de onda de 414 nm calibrando el espectrofotómetro con un blanco preparado con agua destilada en sustitución de la muestra filtrada. La concentración de glicerol se determinó, utilizando una curva de calibración preparada con distintas concentraciones de glicerol (Apéndice B).

### **d. Determinación de nitrógeno amoniacal**

El nitrógeno amoniacal residual en el caldo de cultivo se determinó por un método espectrofotométrico, cuyo principio es la formación de un compuesto azul intenso (indofenol), el cual es formado por la reacción del amonio, fenol e hipoclorito alcalino e intensificado con nitroprusiato de sodio. El color azul formado es proporcional a la concentración de amonio (Solórzano, 1969). Se utilizó un espectrofotómetro SPECTRONIC 200 utilizando una longitud de onda de 662 nm.

Para la preparación de la muestra se colocó 1 mL de muestra filtrada en un tubo de reacción (realizando la correspondiente dilución de ser necesario); a la cual se le agregó 1 mL de solución A (Apéndice A) y se agitó en vortex,

posteriormente se agregó 1 mL de solución B (Apéndice A) y se agitó en vortex; por último se añadieron 2 mL de solución D (Apéndice A) y se agitó en vortex nuevamente. Los tubos de reacción se mantuvieron a temperatura de laboratorio durante 30 minutos y posteriormente se registró su absorbancia. Se utilizó un blanco como referencia sustituyendo la muestra por agua destilada, tratada bajo las mismas condiciones.

La concentración de nitrógeno presente durante cada tiempo de muestreo se determinó utilizando un modelo lineal generado en la realización de la curva de calibración realizada previamente a las mismas condiciones de análisis de la muestra utilizando concentraciones conocidas de nitrógeno (Apéndice B).

#### **e. Determinación de fosfatos**

La concentración de fosfatos en solución acuosa se determinó por un método colorimétrico (Juárez y Rochín, 1966), donde el molibdato de amonio reacciona en medio ácido para formar un ácido complejo que se reduce a un compuesto intensamente colorido (azul de molibdeno). Para la medición de la muestra se utilizó un espectrofotómetro SPECTRONIC 200 a una longitud de onda de 690 nm.

Para la preparación de la muestra se colocó en un tubo de reacción 2.5 mL de filtrado (haciendo la correspondiente dilución de ser necesario). Se le agregó 100  $\mu$ L de la solución de ácido concentrado de molibdato de amonio (Apéndice A) y se agitó en vortex. Una vez agregado el molibdato se le agregaron inmediatamente 100  $\mu$ L de ácido amino-naftol-sulfónico (Apéndice A) y se agitó en vortex. Los tubos de reacción se dejaron en reposo durante 5 minutos y se procedió a leer su absorbancia. Se utilizó como referencia un blanco preparado con 2.5 mL de agua destilada y tratado bajo las mismas condiciones que la muestra.

La concentración de fosfatos se determinó con el modelo lineal generado por la construcción de la curva de calibración realizada previamente a las mismas condiciones de análisis que la muestra, utilizando soluciones de fosfato a concentraciones conocidas (Apéndice B).

#### **f. Cuantificación del ácido giberélico**

Para cuantificar el ácido giberélico se realizó una extracción líquido-líquido al filtrado recuperado en cada tiempo de muestreo. Una alícuota de 10 mL de filtrado se colocó en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, enseguida se le agregaron 15 mL de acetato de etilo y con ayuda de un agitador magnético se mezcló durante 10 minutos en una placa de agitación. Transcurridos los 10 minutos se transfirió a un embudo de separación donde se dejó reposar durante 2 minutos o hasta que se percibiera una pronunciada separación de las fases. La fase acuosa se recolectó en el matraz Erlenmeyer y se recuperó la fase orgánica que contiene el ácido giberélico en un tubo cónico con tapa rosca de 50 mL. Se realizó una segunda extracción agregando 10 mL de acetato de etilo a la fase acuosa que se recolectó en la primera extracción y se colocó durante 10 minutos en agitación. Pasados los 10 minutos se transfirió el contenido del matraz al embudo de separación, se dejó reposar 2 minutos o hasta que hubiese una notoria separación de las fases y se colocó la fase acuosa en el matraz. La fase orgánica se recuperó nuevamente en el tubo de 50 mL. Se hizo un lavado con 2 mL de acetato de etilo al embudo de separación y el acetato fue recuperado y vertido en el tubo con la fase orgánica. A la muestra recuperada se le eliminó la fase acuosa restante agregando un desecante en una relación 2 g de sulfato de sodio anhidro en 27 mL de acetato de etilo, se dejó reposar durante 10 minutos y por medio de decantación se recuperó la fase orgánica (Rios-Irbe y col., 2011); una vez eliminada la fase acuosa restante, la muestra se colocó en un rotavapor a una temperatura de 35 °C y una presión absoluta de 150 mbar para eliminar el acetato de etilo;

posteriormente la muestra se resuspendió en 1.5 mL de metanol grado HPLC. Una vez que la muestra se encontraba en metanol se procedió a realizar la cuantificación del ácido giberélico.

El ácido giberélico producido en el caldo de cultivo se determinó por espectrofotometría como lo publicaron Berrios y col. (2004) con algunas modificaciones, siguiendo el principio de la conversión química de GA<sub>3</sub> a ácido giberelénico (GE) y tomando ventaja de que la velocidad inicial de degradación es lineal, al menos en los primeros 2 minutos de reacción, cuando se le añade el ácido clorhídrico a la muestra. La pendiente de la línea de conversión del ácido giberelénico se relacionó con la concentración inicial de GA<sub>3</sub> en la muestra.

Para la medición se tomaron 50 µL de muestra filtrada (haciendo dilución de ser necesario) y 350 µL de metanol grado HPLC y se colocaron en un tubo de reacción. Se añadió 1.6 mL de HCl a una concentración de 3.75 M (Apéndice A) y se agitó vigorosamente en vortex durante 10 segundos y se comenzó su lectura espectrofotométrica a los 20 segundos de haber añadido el HCl. La absorbancia de la reacción resultante se leyó en un espectrofotómetro GENESYS 10 UV a una longitud de onda de 254 nm registrando lectura en intervalos de 20 segundos durante 2 minutos. Se utilizó un blanco como referencia utilizando metanol grado HPLC en vez de muestra, tratado bajo las mismas condiciones.

La concentración de GA<sub>3</sub> se determinó utilizando el modelo lineal generado con la curva de calibración realizada bajo las mismas condiciones que la muestra, utilizando concentraciones conocidas de GA<sub>3</sub>. De estas lecturas se obtuvieron correlaciones lineales de la degradación del GA<sub>3</sub> al GE (Apéndice B), las cuales sirvieron para obtener la pendiente y así poder calcular la concentración de GA<sub>3</sub> (Apéndice B).

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

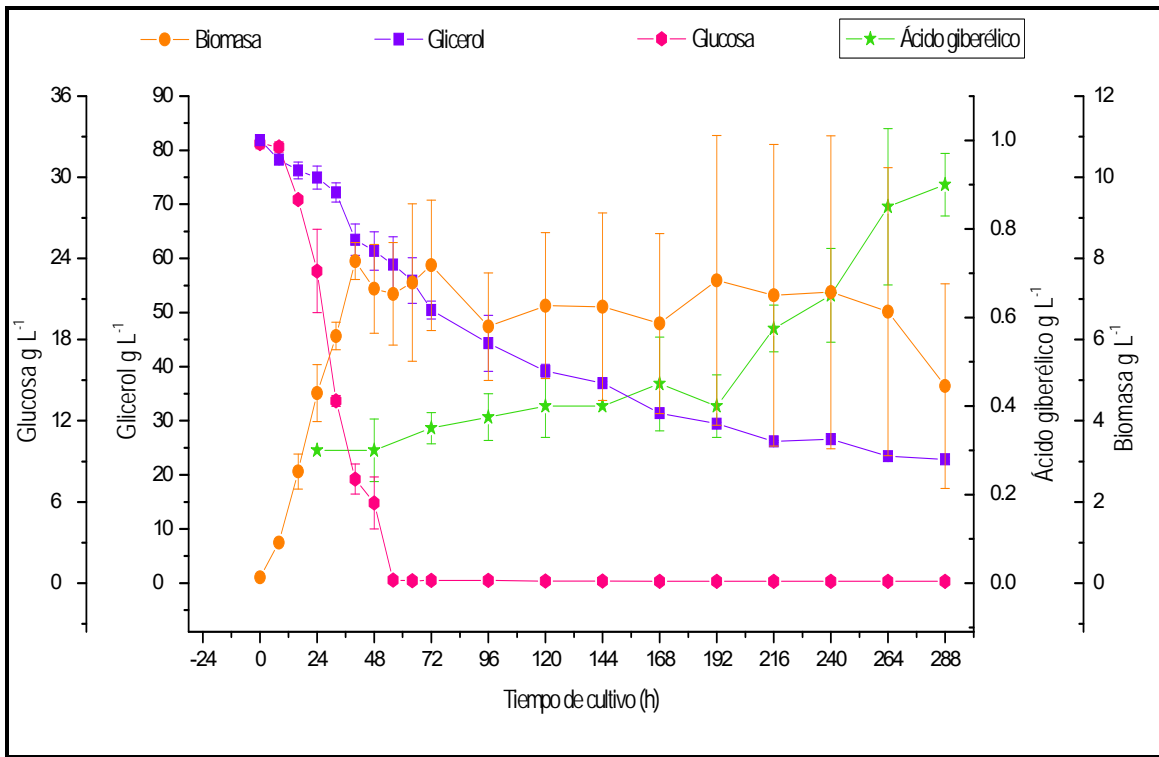
### A. Cultivo microbiano a nivel reactor para la producción de GA<sub>3</sub>

Se investigó el efecto que tiene el utilizar glucosa y glicerol como fuente de carbono mixta sobre la producción de GA<sub>3</sub> y se comparó con los cultivos donde se empleó glucosa y glicerol como única fuente de carbono.

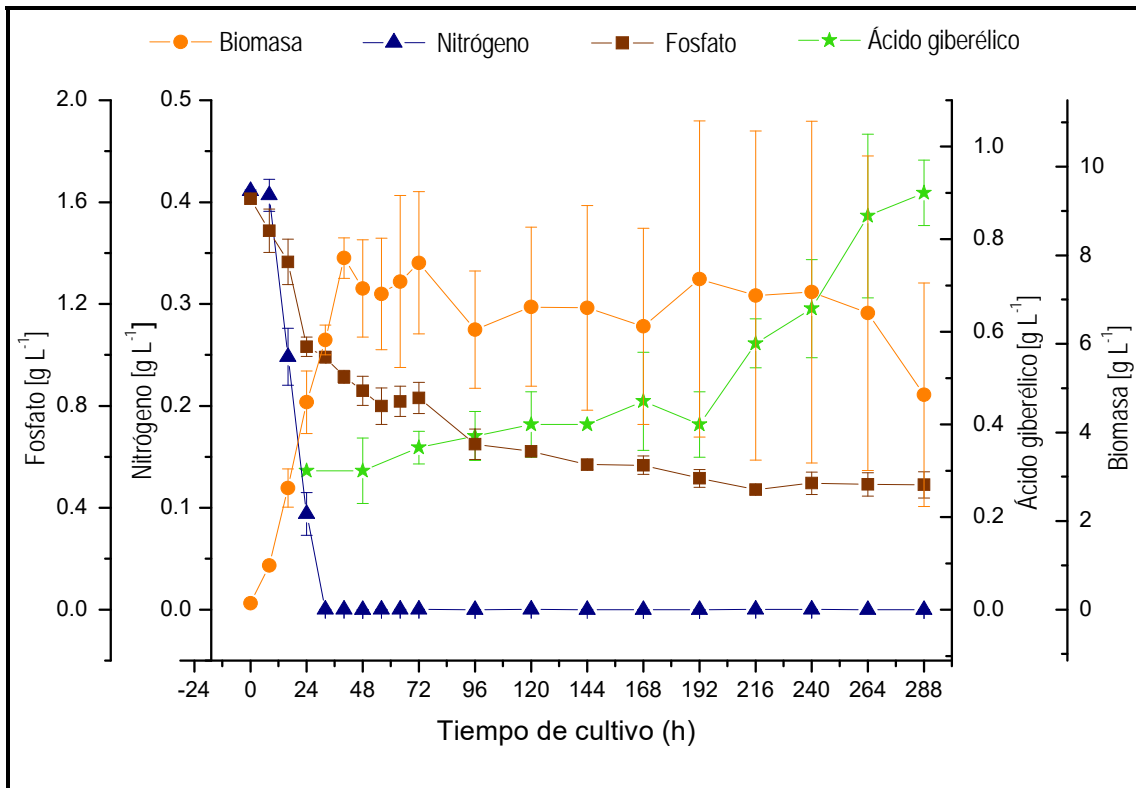
En las **Figuras 9 y 10** muestran las cinéticas del cultivo microbiano de *G. fujikuroi* utilizando la fuente de carbono mixta glucosa-glicerol (1:2) en base a 40 g L<sup>-1</sup> de C total para la producción de GA<sub>3</sub>.

En la **Figura 9** se muestra la curva de crecimiento donde se puede observar que la etapa de crecimiento exponencial llega hasta las 32 h del cultivo, pasado este periodo sobreviene la fase estacionaria. Además no se percibió la fase de latencia, esto puede ser debido a que el hongo creció en un medio de propagación previo a ser inoculado en el medio de producción, por tanto se presume que el hongo comenzó su crecimiento de manera vigorosa. La mayor producción de biomasa se obtuvo a las 40 h del cultivo alcanzando una concentración de 7.93 g L<sup>-1</sup>. Asimismo se observó que la fuente de nitrógeno inorgánico es rápidamente consumida por el microorganismo, agotándose a las 32 h de cultivo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Martínez-Torres (2014) y Quijano-Ortiz (2015), quienes trabajaron con fuente de carbono mixta glucosa-aceite de maíz y Ramos-Lozano (2015) quien trabajó de manera similar en cultivos a nivel matraz pero utilizando una fuente mixta de carbono de glucosa y glicerol para la producción de GA<sub>3</sub> bajo condiciones limitadas de nitrógeno. Con respecto a los fosfatos se observó un mayor consumo durante las primeras 32 h, que corresponde a la fase exponencial mostrada por el hongo *G. fujikuroi*.

La **Figura 10** muestra la evolución del cultivo con la fuente de carbono mixta en donde se observa un consumo casi total de glucosa (más del 99 %) durante las primeras 56 h y alcanzando una concentración residual de este



**Figura 9.** Cinéticas de producción de biomasa y ácido giberélico y consumo de la fuente de carbono en el experimento donde se empleó la fuente de carbono mixta.



**Figura 10.** Cinética de producción de biomasa y ácido giberélico y consumo de nitrógeno y fosfato utilizando fuente de carbono mixta.

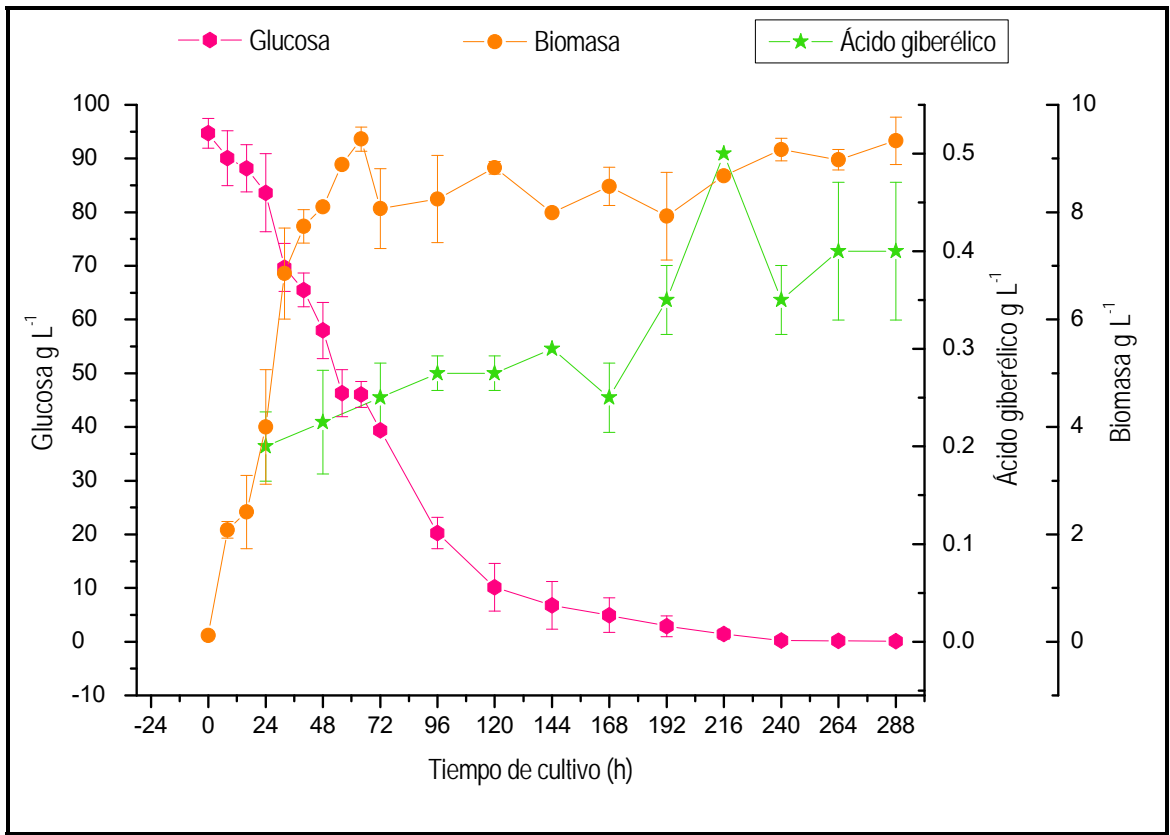


sustrato de  $0.1254 \text{ g L}^{-1}$  al término del cultivo. Por otra lado el consumo de glicerol es más lento comparado con el consumo de glucosa, el consumo de glicerol es constante durante la mayor parte que dura el cultivo, se observó que el consumo ya no fue significativo a partir de las 216 h. El valor residual del glicerol fue de  $22.84 \text{ g L}^{-1}$  (28 % con respecto a la concentración inicial del cultivo) al final del experimento, por lo que se presume que la cantidad de glicerol a utilizar en este proceso se puede reducir, lo que puede ser una buena propuesta para disminuir los costos de producción de este proceso. La producción máxima de  $\text{GA}_3$  fue de  $0.9 \text{ g L}^{-1}$  en la etapa final del cultivo (288 h). Dicho tiempo de producción es similar con lo reportado por Rios-Irbe en el 2013 para la fuente mixta glucosa-aceite de maíz.

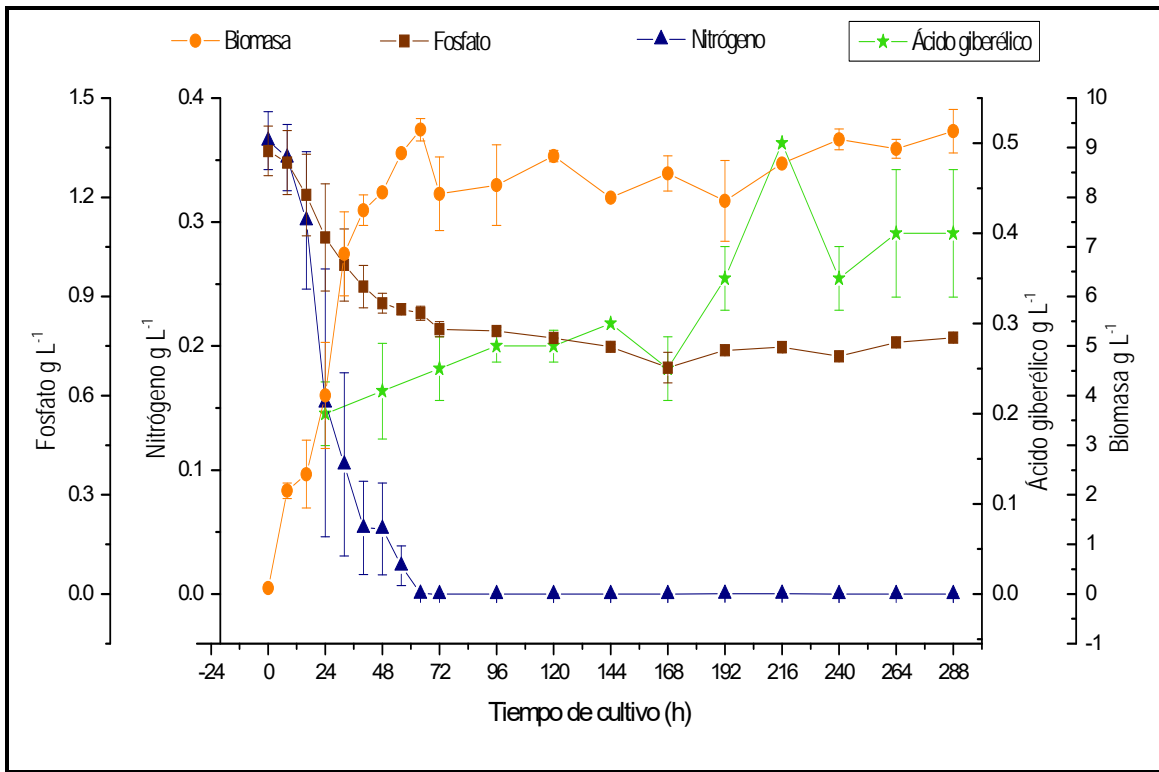
En las **Figuras 11 y 12** se presentan las diferentes cinéticas de producción de biomasa y  $\text{GA}_3$  y consumo de nutrientes utilizando glucosa como única fuente de carbono.

En la **Figura 11** la curva de crecimiento de *G. fujikuroi* durante su cultivo, la fase de crecimiento exponencial terminó a las 48 h del cultivo, aunque se observa que la mayor producción de biomasa no se alcanzó sino hasta las 64 h de cultivo con una concentración de  $9.36 \text{ g L}^{-1}$ . Aunque este medio presentó la mayor cantidad de biomasa producida comparada con los experimentos donde se utilizó la fuente mixta y sólo glicerol como fuente de carbono, el análisis estadístico (**Cuadro 3**) muestra que no hay diferencias significativas en la producción de biomasa entre los diferentes experimentos.

El experimento no presentó la fase de adaptación por parte del hongo al medio de cultivo. En lo que respecta al consumo de nitrógeno y fosfato, se observa un rápido consumo de ambos nutrientes durante la fase de crecimiento exponencial. La fuente de nitrógeno se agotó a las 64 h del cultivo. El mayor consumo de fosfato se presentó entre las 0 y 48 h del bioproceso, después de este tiempo la concentración de fosfato se mantuvo relativamente constante por



**Figura 11.** Cinéticas de producción de biomasa y ácido giberélico y consumo de la fuente de carbono en el experimento donde se empleó sólo glucosa como fuente de carbono.



**Figura 12.** Cinética de producción de biomasa y ácido giberélico y consumo de nitrógeno y fosfato del experimento donde se utilizó sólo glucosa como fuente de carbono.

**Cuadro 3.** Análisis de varianza de la producción de biomasa utilizando las diferentes fuentes de carbono.

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre tratamientos	44.76536	2	22.38268	1.946129	0.1477	3.078057
Error aleatorio (dentro de los tratamientos)	1276.625	111	11.50113			
Total	1321.391	113				

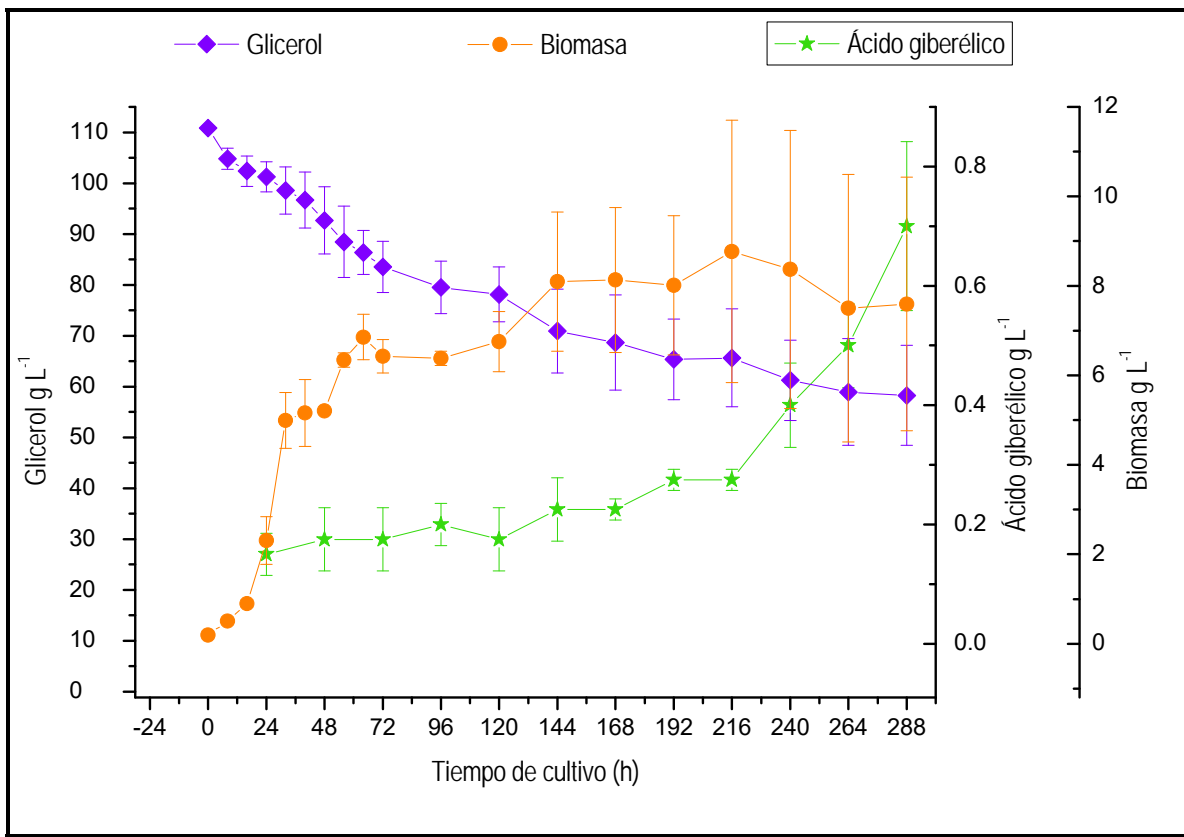
lo que se especula que su consumo cesó al entrar la el hongo a su fase estacionaria de crecimiento.

En la **Figura 11** se muestra el comportamiento de la glucosa cuando fue utilizada como única fuente de carbono, donde se observó un consumo casi total de este sustrato (más del 99 %) a las 240 h de cultivo quedando una concentración residual de  $0.1113 \text{ g L}^{-1}$  al término del cultivo. La mayor producción de GA<sub>3</sub> se alcanzó a las 216 h con una concentración de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ .

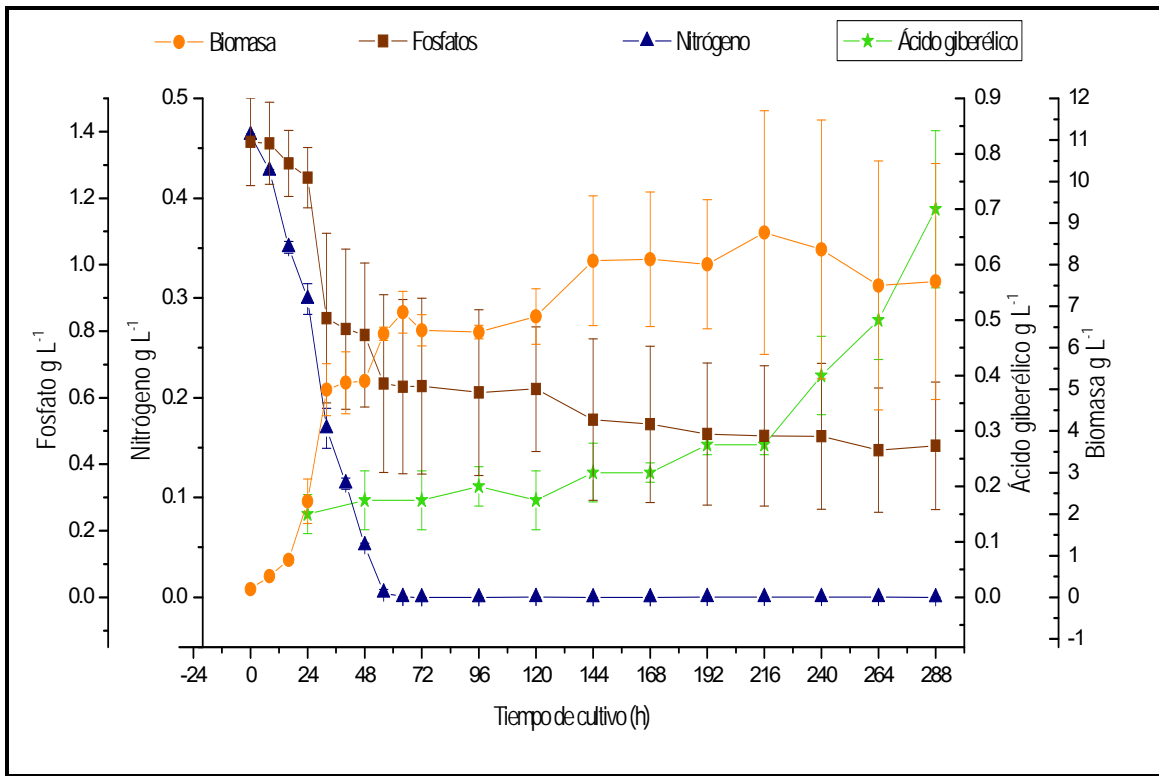
El rápido metabolismo de sustratos como glucosa y nitrógeno a menudo puede lograr tasas máximas de crecimiento celular, pero se sabe que inhibe la producción de muchos metabolitos secundarios. A este fenómeno se le conoce como “represión catabólica” y se piensa que es debido a intermediarios generados a partir del rápido catabolismo de la glucosa que interfiere con las enzimas en el proceso de metabolismo secundario (Rios-Iribe y col., 2011). Las células de rápido crecimiento tienen por lo general el metabolismo secundario “apagado” hasta que su tasa de crecimiento disminuye. Esto puede conducir a un perfil de cultivo bifásico, sin producción durante el crecimiento, sólo durante la fase estacionaria (Marwick y col., 1999).

En las **Figuras 13 y 14**, se presentan las diferentes cinéticas de producción de biomasa y GA<sub>3</sub> y de consumo de nutrientes utilizando glicerol como única fuente de carbono.

La **Figura 14** muestra la curva de crecimiento de *G. fujikuroi* durante su cultivo, donde la fase exponencial culminó a las 64 h, pasado este tiempo se observó un ligero aumento en la concentración de biomasa pero sin mostrar un aumento significativo. Es importante resaltar que *G. fujikuroi* no presentó fase de adaptación para estos experimentos. La mayor producción de biomasa de  $8.77 \text{ g L}^{-1}$ , se registró a las 216 h del bioproceso. Se observó que el nitrógeno inorgánico fue metabolizado rápidamente, agotándose a las 56 h del cultivo microbiano. El mayor consumo de fosfatos se dio durante las primeras 56 h,



**Figura 13.** Cinéticas de producción de biomasa y ácido giberélico y consumo de la fuente de carbono en el experimento donde se empleó sólo glicerol como fuente de carbono.



**Figura 14.** Cinética de producción de biomasa y ácido giberélico y consumo de nitrógeno y fosfato del experimento donde se utilizó sólo glicerol como fuente de carbono.

durante el resto del cultivo no se apreció un consumo importante de este sustrato.

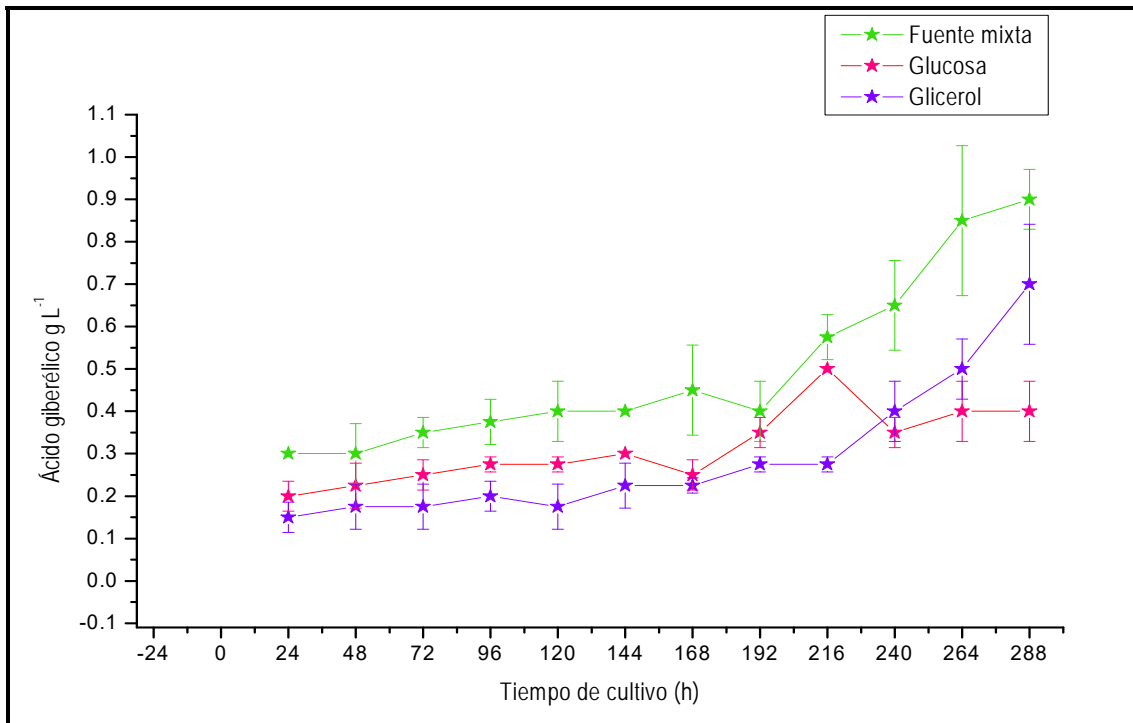
En la **Figura 13** se muestra el comportamiento del cultivo microbiano cuando se utilizó glicerol como única fuente de carbono, durante todo el experimento hubo consumo de glicerol, quedando una concentración residual de 58.26 g L<sup>-1</sup> (más del 50 %). La mayor producción de GA<sub>3</sub> (0.7 g L<sup>-1</sup>) se registró en la etapa final del bioproceso.

En todos los casos de estudio se observó que la mayor producción de ácido giberélico se obtuvo durante la fase estacionaria de la curva de crecimiento del microorganismo. Este comportamiento es característico para cinéticas de metabolito secundario como ácido giberélico.

## **B. Producción de GA<sub>3</sub>**

En la **Figura 15** se aprecia el efecto sobre la producción de GA<sub>3</sub> de los diferentes experimentos durante el cultivo de *Gibberella fujikuroi* bajo las condiciones de estudio. En los diferentes experimentos se determinó la producción de GA<sub>3</sub> a partir de las 24 h de haber iniciado el cultivo. Se observa que la fuente de carbono mixta produce un efecto inductivo en la producción de GA<sub>3</sub> y afecta la cantidad de GA<sub>3</sub> producido con respecto a la utilización de sólo glucosa y sólo glicerol como fuente de carbono. En el **Cuadro 4** se dan las concentraciones y rendimientos (g GA<sub>3</sub> / g biomasa) máximos alcanzados en cada uno de los experimentos; ambos corresponden al valor máximo de ácido giberélico producido. Usando glucosa como única fuente de carbono se produjo la menor cantidad de GA<sub>3</sub> (0.5 g L<sup>-1</sup>) a las 216 h; con glicerol a las 288 h se encontró una producción de GA<sub>3</sub> de 0.7 g L<sup>-1</sup>, siendo 1.4 veces mayor que con sólo glucosa. En cambio, cuando se utilizó la mezcla glucosa-glicerol 1:2 se produjo la mayor producción de GA<sub>3</sub> a las 288 h (0.9 g L<sup>-1</sup>). El uso de distintas fuentes de carbono afecta la máxima concentración de la fitohormona obtenida.





**Figura 15.** Cinéticas de producción de ácido giberílico de los experimentos utilizando distintas fuentes de carbono.

**Cuadro 4.** Producción máxima de ácido giberélico y biomasa durante los experimentos de cultivo microbiano.

<b>Experimento</b>	<b>Fuente mixta</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Glicerol</b>
<b>GA<sub>3</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	0.9	0.5	0.7
<b>Biomasa (g L<sup>-1</sup>)</b>	4.854588	8.677551	7.596154
<b>Rendimiento g GA<sub>3</sub> / g biomasa</b>	0.1854	0.0576	0.0921

Cuando se utilizó sólo glucosa como fuente de carbono, se obtuvieron los valores más bajos de producción de ácido giberélico, por el contrario en los experimentos donde se utilizó glicerol se observó un notable aumento en la producción de este metabolito. El glicerol es una fuente de carbono más eficiente que la glucosa para la producción de algunos productos microbianos. Sin embargo, las razones específicas de porque glicerol es mejor que la glucosa como fuente de carbono aún no se han elucidado completamente (Chen y col., 2012).

La fuente mixta glucosa-glicerol (1:2) fue la mezcla óptima para la producción de GA<sub>3</sub>, bajo las condiciones de estudio. Los cultivos microbianos con fuente de carbono mixta son una estrategia eficaz para la mejora de los productos metabólicos y se ha aplicado ampliamente en la industria de la fermentación. Por ejemplo, la co-fermentación glicerol-glucosa se ha empleado para mejorar la producción de ácido propiónico y de 1,3-propanodiol, la co-fermentación glucosa-glicerol-xilosa se ha llevado a cabo para mejorar la producción de *p*-hidroxibenzoato, y una mezcla de aceite de maíz y glucosa se ha utilizado como una fuente de carbono mixta para aumentar la producción de ácido giberélico. Varias explicaciones se han propuesto 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 de producto; (2) proporcionan una fuente de carbono específica para la síntesis de precursores metabólicos (Chen y col., 2012).

De una manera similar al carbono, la fuente de nitrógeno puede regular el metabolismo secundario. La biosíntesis de GAs como metabolitos secundarios en *Gibberella fujikuroi* está regulada por la fuente de nitrógeno, la producción comienza al agotarse este en el medio de cultivo (Sanchez Fernandez y col., 1997; Giordano y Domenech, 1999; Marwick y col., 1999). En las **Figuras 11, 13 y 15** se puede observar que la fuente de nitrógeno

inorgánico es rápidamente consumida por el microorganismo. En todos los experimentos la producción de GA<sub>3</sub> se observa desde las 24 h de cultivo (**Figura 15**). Escamilla y col., 2000, encontraron que en *Gibberella fujikuroi* el crecimiento exponencial cesa cuando la fuente de nitrógeno asimilable se agota en el medio de cultivo, entonces sobreviene la idiofase (fase de crecimiento microbiano en la que se producen metabolitos secundarios) con la cual se inicia la formación de GAs.

El fosfato, es esencial para el crecimiento de microorganismos ya que los iones fosfatos están involucrados en todas las reacciones que requieren energía (por ejemplo: para la síntesis de ADN y ARN), a pesar de esto, se ha encontrado que a ciertas concentraciones puede reprimir el metabolismo secundario, inhibiendo por ejemplo, fosfatasas y oxigenasas (Spizek y tichy 1995). Sin embargo, en *G. fujikuroi* la biosíntesis (Spížek y Tichý, 1995) de las GAs aparentemente no está regulada por la concentración de fosfato o la tasa de crecimiento (Giordano y Domenech, 1999).

A los resultados descritos anteriormente se les aplicó un análisis estadístico y se encontró una diferencia significativa en la producción de GA<sub>3</sub> para los tratamientos propuestos (**Cuadro 5**).

En general, el resultado de la ANOVA es de carácter informativo y su aplicación no es suficiente para un análisis definitivo (Castaño y Domínguez, 2001). Es por ello, que además del análisis de varianza se utilizó la prueba de Tukey en el análisis de los resultados obtenidos. La prueba de Tukey permitió comparar todos los experimentos por pares, para realizar dicha prueba, se tomó el valor máximo de producción de GA<sub>3</sub> de cada experimento. En el **Cuadro 6** se intuye que tanto el experimento donde se utilizó la fuente de carbono mixta presenta diferencias significativas con respecto a los experimentos donde se utilizó sólo glucosa como fuente de carbono y sólo glicerol como fuente de carbono, pero entre estos dos últimos no presentaron diferencia estadística.

**Cuadro 5.** Análisis de varianza de la producción de ácido giberélico utilizando las diferentes fuentes de carbono.

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Valor p</i>	<i>F crítico</i>
Entre tratamientos	608125	2	304062.5	9.2348	0.000279	3.129644
Error aleatorio	2271875	69	32925.72			
Total	2880000	71				

**Cuadro 6.** Comparación de medias de los diferentes experimentos en la producción de ácido giberélico mediante la prueba de Tukey.

<b>Comparación de medias</b>	<b>Diferencia en la producción de GA<sub>3</sub></b>	<b>Valor estadístico de Tukey (T)</b>	<b>Intervalo de confianza</b>	<b>Diferencia significativa</b>
<b>E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub></b>	181.2	176.488	181.2 ± <i>T</i>	SI
<b>E<sub>1</sub>-E<sub>3</sub></b>	206.2	176.488	206.2 ± <i>T</i>	SI
<b>E<sub>2</sub>-E<sub>3</sub></b>	25	176.488	25 ± <i>T</i>	NO

E<sub>1</sub>: media del experimento donde se utilizó la fuente mixta de carbono, E<sub>2</sub>: media del experimento donde se empleó sólo glucosa como fuente de carbono y E<sub>3</sub>: media del experimento donde se empleó sólo glicerol como fuente de carbono.

Debido a que el primer intervalo analizado E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub> es mayor al valor estadístico de Tukey indica que la diferencia en la producción de GA<sub>3</sub> entre los dos tratamientos es estadísticamente significativa. Esto quiere decir que la producción de GA<sub>3</sub> es mayor cuando se utiliza la fuente mixta de carbono glucosa-glicerol que cuando se utiliza glucosa como única fuente de carbono durante el cultivo microbiano con el hongo *Gibberella fujikuroi*.

De manera similar, en el segundo intervalo analizado E<sub>1</sub>-E<sub>3</sub> es mayor al valor estadístico de Tukey, lo que significa que si existe una diferencia significativa entre estos tratamientos. Esto se traduce en que la producción de GA<sub>3</sub> es mayor cuando se utiliza la fuente de carbono mixta que cuando se utiliza sólo glicerol como fuente de carbono.

El tercer intervalo analizado E<sub>2</sub>-E<sub>3</sub> es menor al valor estadístico de Tukey por tanto, la diferencia en la producción de GA<sub>3</sub> entre los dos tratamientos no es estadísticamente significativa. Esto es, que los promedios en los experimentos 2 y 1 son iguales estadísticamente para un nivel de significancia de 95 % ( $\alpha=0.05$ ).

Las **Figuras 13 y 14** muestran el desarrollo de los cultivos de *Gibberella fujikuroi* utilizando glicerol como fuente de carbono. La máxima producción de GA<sub>3</sub> fue estadísticamente diferente con respecto a la producida utilizando la fuente de carbono mixta, pero no hubo diferencias significativas con respecto a la producción de GA<sub>3</sub> obtenida utilizando glucosa como fuente de carbono.

### **C. Análisis y modelamiento cinético**

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

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

$$k_X = \alpha \left[ \frac{1}{S_{N0}} \left( -\frac{dS_N}{dt} \right) \right] + \beta \quad (1b)$$

$$\mu = k_x \left( 1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \quad (1c)$$

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

$k_x$  = coeficiente logístico

$\mu$  = constante cinética de crecimiento de biomasa (Apéndice C)

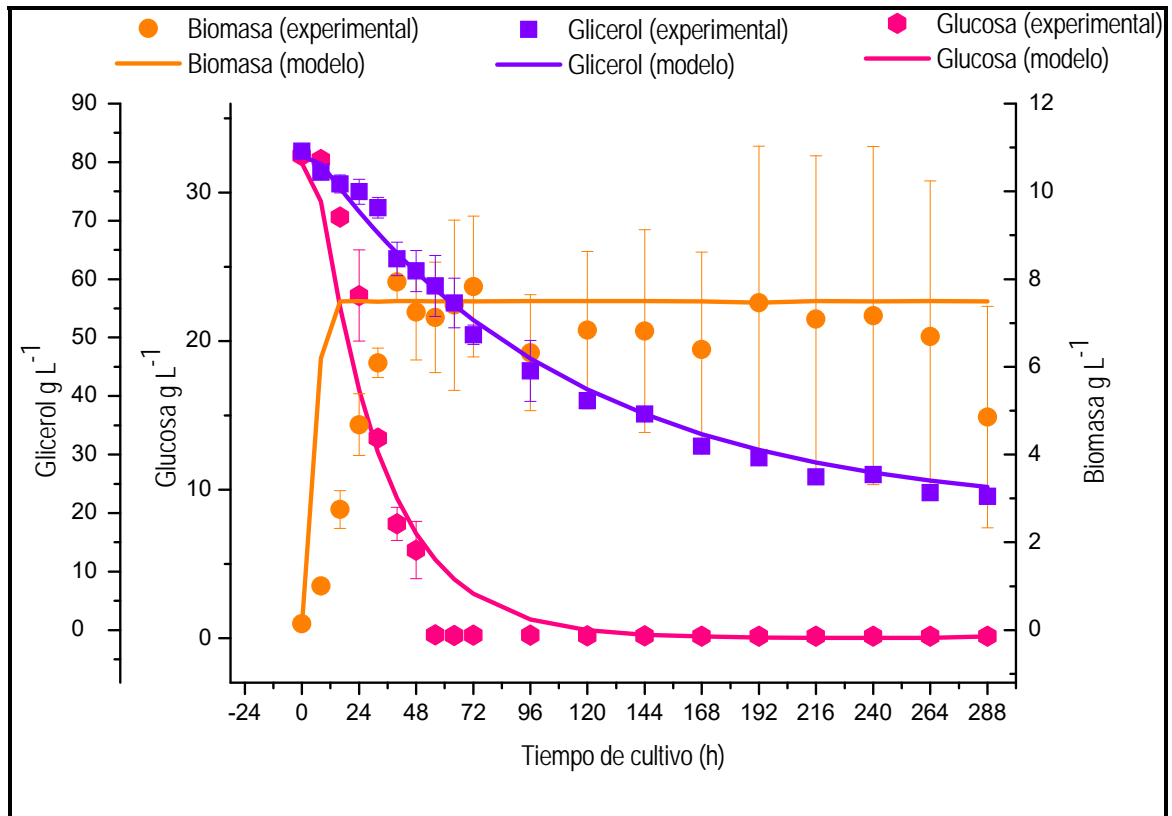
En el **Cuadro 7** se presentan los valores de los parámetros obtenidos para las cinéticas de crecimiento de biomasa utilizando la ecuación (1), los cuales fueron determinados mediante la minimización de la suma de los errores al cuadrado mediante un código desarrollado en Matlab, el cual consistió en una técnica de integración basada en el método de Runge-Kutta-Fehlberg (Mathews y Fink, 2004).

En las **Figuras 16, 17 y 18** se presentan una comparación entre los datos experimentales y los generados por el modelo para la cinética de producción de biomasa, y puede indicarse que existe un buen ajuste entre el modelo propuesto y los datos experimentales obtenidos. Para los experimentos donde se utilizó la fuente de carbono mixta y sólo glucosa, se observa que la fase estacionaria fue alcanzada a las 40 h de cultivo, mientras que en el experimento donde se empleó sólo glicerol como fuente de carbono, ocurrió aproximadamente a las 56 h. Además, el modelo predice que la producción máxima de concentración de biomasa fue de 7.49, 8.49 y 8.09 g L<sup>-1</sup> para los experimentos que utilizaron la fuente mixta, glucosa y glicerol como fuente de carbono, respectivamente.

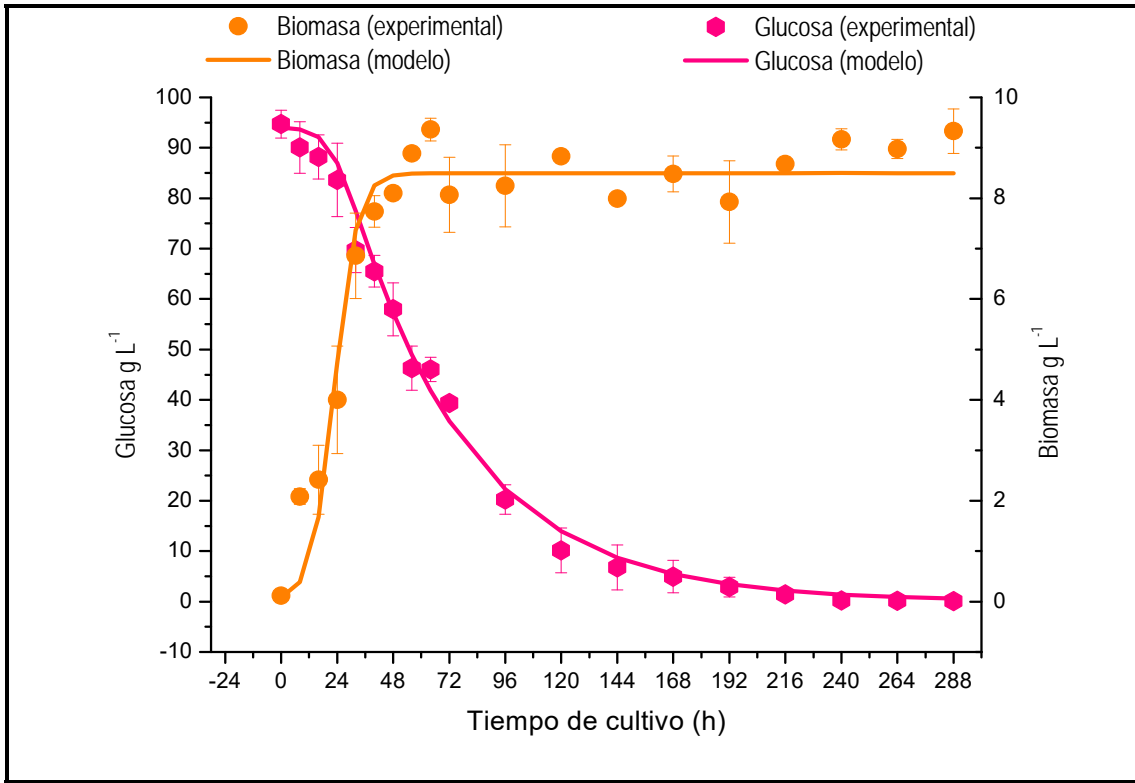


**Cuadro 7.** Parámetros de ajuste del modelo logístico para la cinética de producción de biomasa de todos los tratamientos.

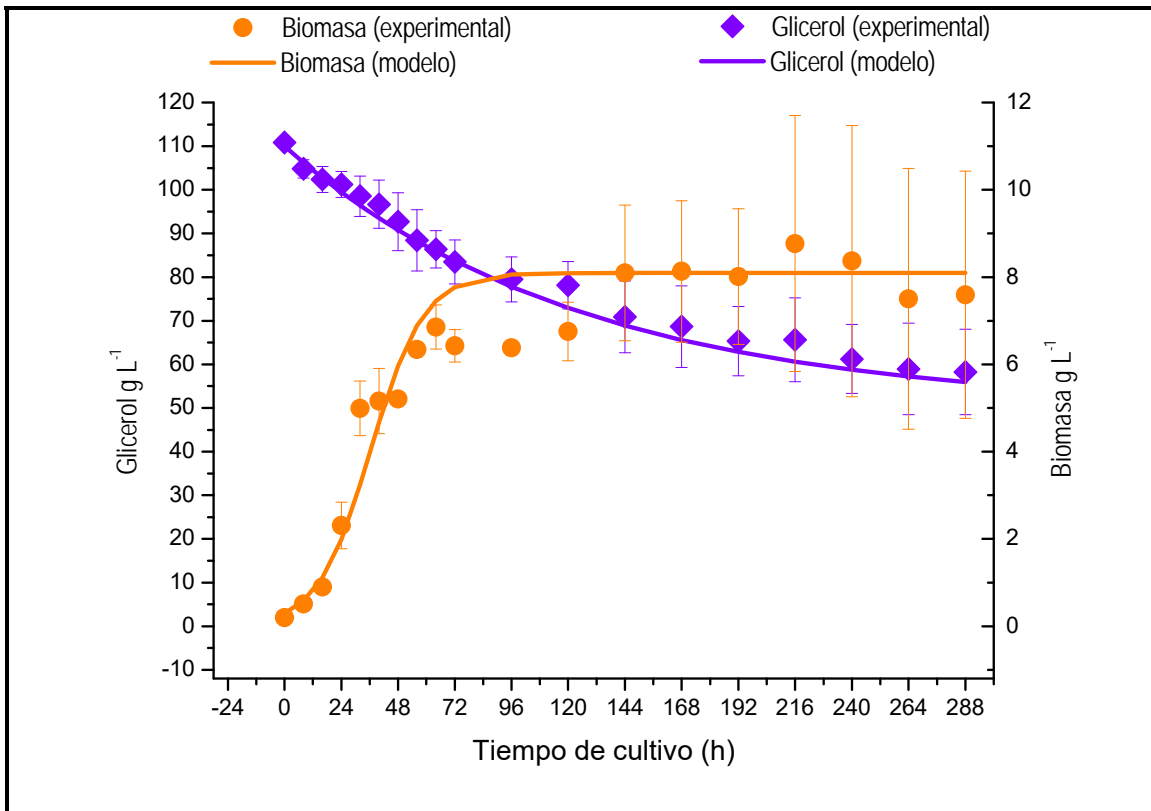
<b>Tratamiento</b>	<b>X<sub>0</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>X<sub>max</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>α</b>	<b>β</b>
<b>Glucosa</b>	0.0784	8.4959	6.293 x 10 <sup>-3</sup>	0.1801
<b>Fuente mixta</b>	0.0889	7.4975	0.0075	0.7661
<b>Glicerol</b>	0.2952	8.0959	7.878 x 10 <sup>-3</sup>	0.0809



**Figura 16.** Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de sustrato empleando la fuente mixta de carbono.



**Figura 17.** Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de sustrato empleando sólo glucosa como fuente carbono.



**Figura 18.** Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de sustrato empleando sólo glicerol como fuente carbono.

Una variante del modelo logístico fue utilizada para modelar el consumo de los sustratos basados en la fuente de carbono. Para esto la concentración de biomasa de la ecuación (1) fue sustituido por el consumo alcanzado de sustrato, el cual está dado por  $S - S_{res}$ , obteniéndose la siguiente expresión:

$$\frac{dS}{dt} = -Xk_s(S - S_{res}) \quad \text{para } S(0) = S_0 \quad (3)$$

Donde los parámetros del modelo son:

$S_0$  = Concentración inicial de sustrato

$S_{res}$  = Concentración de sustrato residual

$k_s$  = Constante cinética de sustrato

Se realizó la optimización de los parámetros de ajuste de la ecuación (3) para las cinéticas de consumo de sustratos basados en carbono para cada tratamiento experimental, y los resultados obtenidos se reportan en el **Cuadro 8**.

En las **Figuras 16, 17 y 18** 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 como de la fuente de carbono.

Con respecto a las cinéticas de consumo de nitrógeno se realizó un análisis donde se observó que el comportamiento fue muy similar para todos los experimentos. Las tendencias encontradas en los datos experimentales indicaron un comportamiento logístico. El consumo de nitrógeno fue ajustado a la siguiente ecuación:

$$\frac{dS_N}{dt} = -k_N(S_N - S_{Nres}) \left( 1 - \frac{S_N - S_{Nres}}{S_{N0}} \right) \quad S_N(t = 0) = S_{N0} \quad (4)$$

**Cuadro 8.** Parámetros de ajuste del modelo logístico para la cinética de consumo de las diferentes fuentes de carbono.

<b>Tratamiento</b>	<b>S<sub>0</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>S<sub>∞</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>K<sub>s</sub> (h<sup>-1</sup>)</b>
<b>Glucosa</b>	94	0.1	0.0023
<b>Fuente mixta</b>			
<b>Glucosa</b>	32	0.1	0.0048
<b>Glicerol</b>	81	20	0.0013
<b>Glicerol</b>	110	50	0.0080

Donde:

$S_N$  = Concentración de nitrógeno para cualquier tiempo

$S_{N0}$  = Concentración de nitrógeno al inicio del cultivo

$S_{Nres}$  = Concentración de nitrógeno residual

$k_N$  = Coeficiente logístico de consumo de nitrógeno.

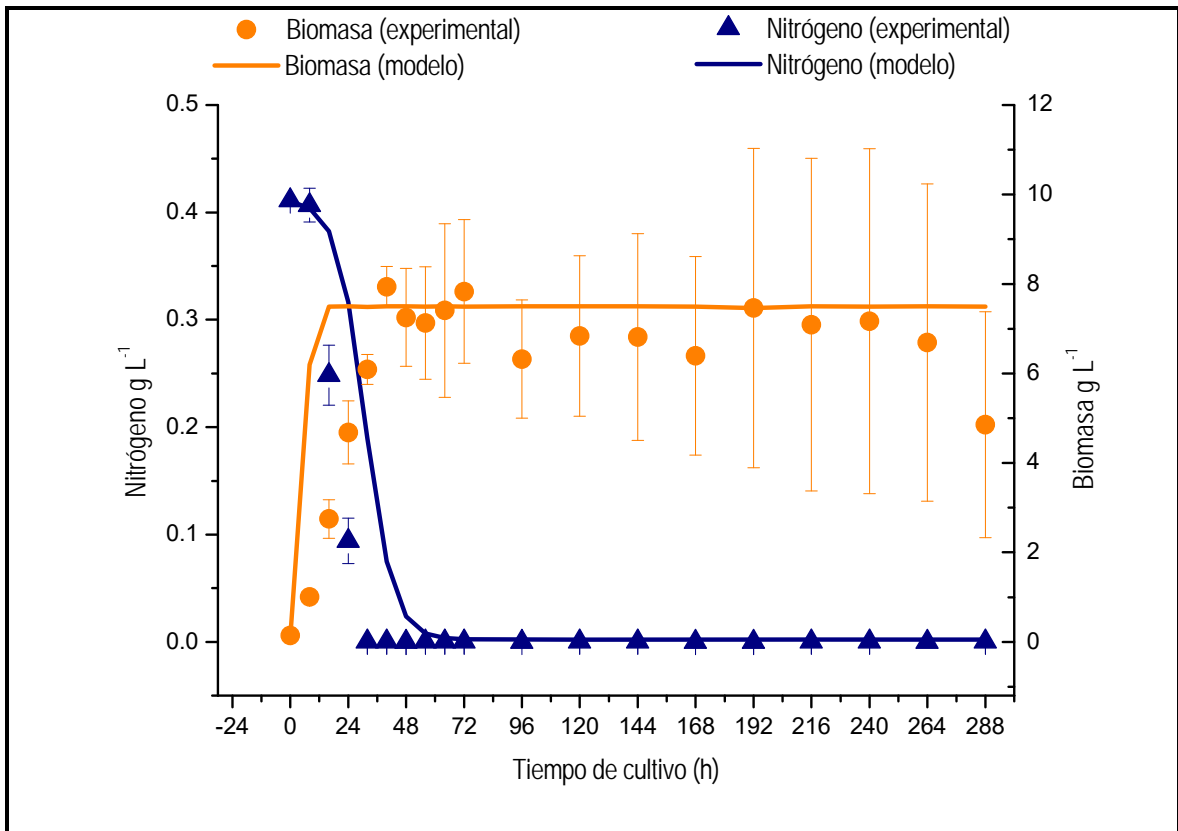
Se realizó la optimización de los parámetros de ajuste de la ecuación (4) para las cinéticas de consumo de nitrógeno para cada tratamiento experimental, y los resultados obtenidos se reportan en el **Cuadro 9**.

En las **Figuras 19, 20 y 21** se presentan una comparación entre los datos experimentales y numéricos de todas las cinéticas de consumo de nitrógeno, y se observa que el modelo logístico representa apropiadamente el comportamiento dinámico de consumo como de la fuente de nitrógeno.

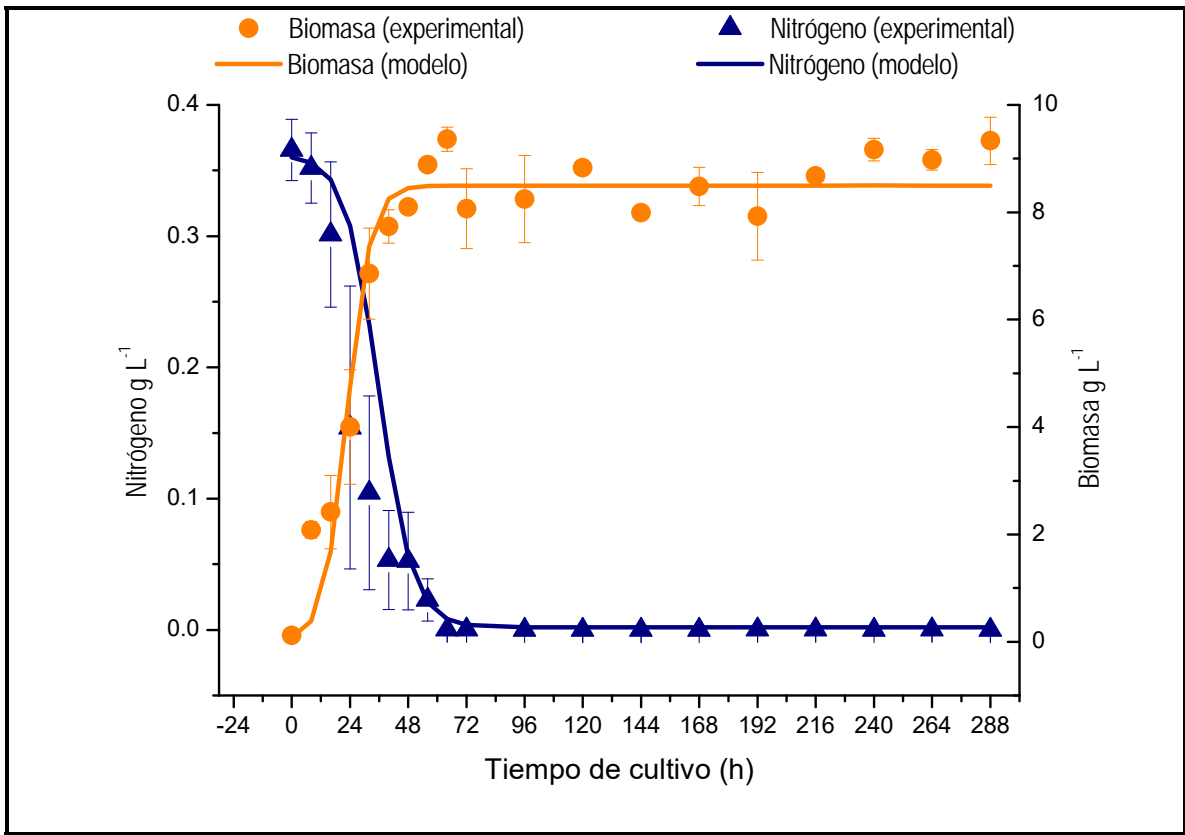
**Cuadro 9.** Parámetros de ajuste del modelo logístico para la cinética de consumo de la fuente de nitrógeno utilizando diferentes fuentes de carbono.

<b>Tratamiento</b>	<b>S<sub>N0</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>S<sub>Nres</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>K<sub>N</sub> (h<sup>-1</sup>)</b>
<b>Glucosa</b>	0.36	0.002	0.1445
<b>Fuente mixta</b>	0.41	0.0021	0.0013
<b>Glicerol</b>	0.4599	0.0030	0.1801

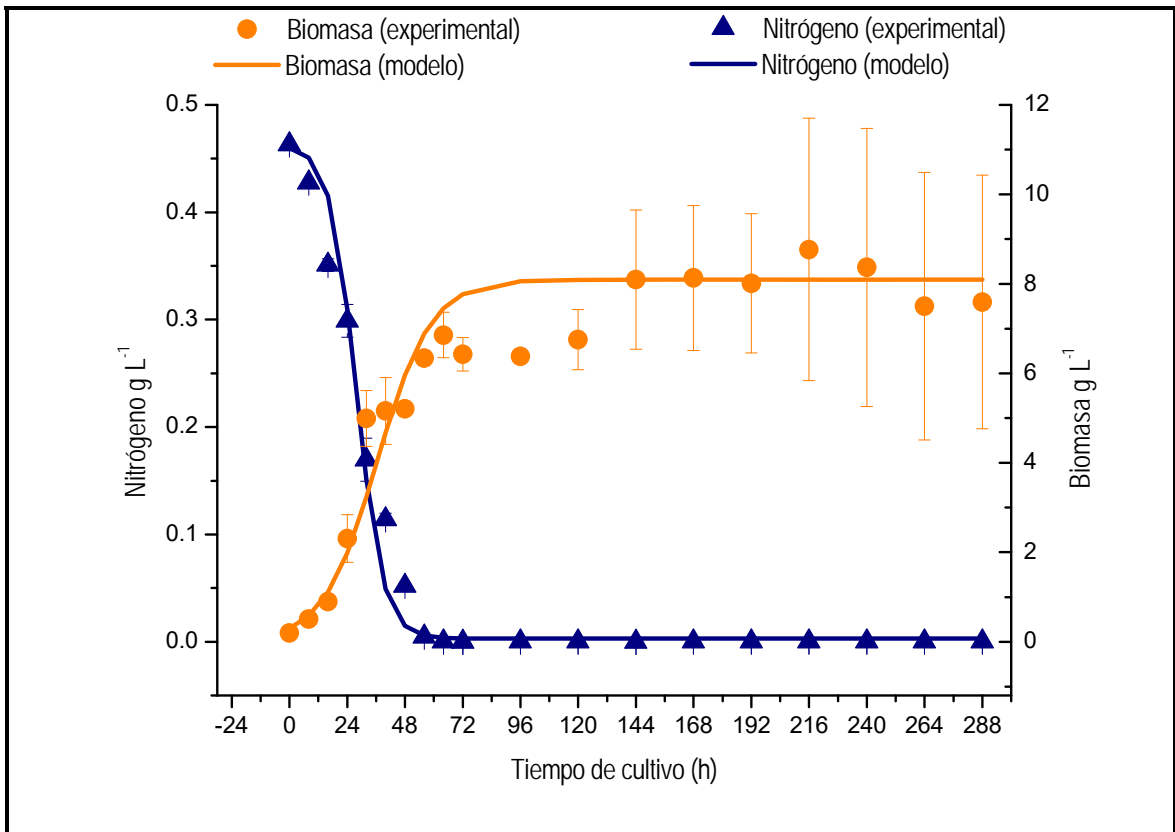




**Figura 19.** Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de nitrógeno en el experimento donde se utilizó la fuente mixta de carbono.



**Figura 20.** Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de nitrógeno en el experimento donde se empleó sólo glucosa como fuente carbono.



**Figura 21.** Ajuste del modelo logístico para la producción de biomasa y consumo de nitrógeno en el experimento donde se empleó sólo glicerol como fuente carbono.

## IX. CONCLUSIONES

1. De acuerdo con el análisis estadístico, la fuente de carbono afectó la máxima producción de GA<sub>3</sub> durante el cultivo de *G. fujikuroi*.
2. Se encontró una producción de 0.9 g L<sup>-1</sup> como la mayor concentración cuando se utilizó la fuente mixta de carbono glucosa-glicerol.
3. Cuando se utilizó la fuente mixta de carbono, ambos sustratos (glucosa y glicerol) fueron consumidos simultáneamente durante el cultivo.
4. Comparando los cultivos de glucosa y glicerol se puede proporcionar una visión más clara de cómo el hongo *G. fujikuroi* consume selectivamente la fuente de carbono. La glucosa se destina mayormente a la formación de biomasa mientras que el glicerol se utiliza principalmente en la fase estacionaria para producir GA<sub>3</sub>.
5. La producción de ácido giberélico mostró diferencias significativas al utilizar la fuente mixta de carbono comparado con los cultivos donde sólo se utilizó glucosa o glicerol como única fuente de carbono.
6. La velocidad de crecimiento de *G. fujikuroi* disminuye conforme se agota la fuente de nitrógeno.
7. Los fosfatos son necesarios para el crecimiento de *G. fujikuroi* pero no durante la producción de GA<sub>3</sub>.
8. El nitrógeno se consumió totalmente en las tres condiciones de estudio durante la fase de crecimiento exponencial, evidenciando su importancia para el crecimiento del microorganismo.
9. El uso de fuente de carbono mixta glucosa-glicerol en cultivo por lotes en biorreactor *airlift* ofrece una buena alternativa para la producción de GA<sub>3</sub> bajo las condiciones de estudio.
10. El modelo logístico representó apropiadamente el comportamiento dinámico de crecimiento y consumo de la fuente de carbono y de nitrógeno.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Afek, U., Aharoni, N., & Carmeli, S. (1993, September). A possible involvement of gibberellic acid in celery resistance to pathogens during storage. In *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance* 381 (pp. 583-588).
- 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(7), 2979-2995.
- Al-Whaibi, M. H., Siddiqui, M. H., Al-Amri, A., & Basalah, M. O. (2010). Performance of faba bean under calcium and gibberellic acid application. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 4(1), 60-63.
- Amrane, A., Pestel, V., & Prigent, Y. (2003). Submerged cultures of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* on amino acids and glucose. *The Journal of general and applied microbiology*, 49(4), 251-255.
- Appleyard, V. C., Unkles, S. E., Legg, M., & Kinghorn, J. R. (1995). Secondary metabolite production in filamentous fungi displayed. *Molecular and General Genetics MGG*, 247(3), 338-342.
- Ates, S., Ozenir, S., & Gökdere, M. (2006). Effect of silicone oil on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* and *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(5), 500-501.
- Baldwin, E. A. (2003). Coatings and other supplemental treatments to maintain vegetable quality. *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*, 413-456.
- Baviera, B., Orenza, V. A., Juan, M., Gariglio, N., & Fonfría, M. A. (2002). La inhibición de la floración en el melocotonero (*Prunus perica* L. Bastch)

- como técnica indirecta de aclareo de frutos. *Fruticultura profesional*, (125), 15-28.
- Berrios, J., Illanes, A., & Aroca, G. (2004). Spectrophotometric method for determining gibberellic acid in fermentation broths. *Biotechnology letters*, 26(1), 67-70.
- Bömke, C., & Tudzynski, B. (2009). Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry*, 70(15), 1876-1893.
- Borrow, A., Brown, S., Jefferys, E. G., Kessell, R. H. J., Lloyd, E. C., Lloyd, P. B., & Swait, J. C. (1964). The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 10(3), 407-444.
- Brückner, B., & Blechschmidt, D. (1991). The gibberellin fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11(2), 163-192.
- Candau, R., Avalos, J., & Cerdá-Olmedo, E. (1992). Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant physiology*, 100(3), 1184-1188.
- Castaño Tostado, E., & Domínguez Domínguez, J. (2001). Diseño de experimentos para el desarrollo tecnológico y mejora industrial/.
- Chavez-Parga, M. C., Gonzalez-Ortega, O., Negrete-Rodriguez, M. L. X., Medina-Torres, L., & Silva, E. M. E. (2007). Hydrodynamics, mass transfer and rheological studies of gibberellic acid production in an *airlift* bioreactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 615-623.
- Chen, X. S., Ren, X. D., Dong, N., Li, S., Li, F., Zhao, F. L., & Mao, Z. G. (2012). Culture medium containing glucose and glycerol as a mixed carbon

- source improves  $\epsilon$ -poly-L-lysine production by *Streptomyces* sp. M-Z18. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(3), 469-475.
- Corey, E. J., Danheiser, R. L., Chandrasekaran, S., Siret, P., Keck, G. E., & Gras, J. L. (1978). Stereospecific total synthesis of gibberellic acid. A key tricyclic intermediate. *Journal of the American Chemical Society*, 100(25), 8031-8034.
- Corey, E. J., & Munroe, J. E. (1982). Total synthesis of gibberellic acid. A simple synthesis of a key intermediate. *Journal of the American Chemical Society*, 104(22), 6129-6130.
- Crow, J. R., Thomson, R. J., & Mander, L. N. (2006). Synthesis and confirmation of structure for the gibberellin GA 131 (18-hydroxy-GA 4). *Organic & biomolecular chemistry*, 4(13), 2532-2544.
- Chávez-Parga, M., González-Ortega, O., Sánchez-Cornejo, G., Negrete, M. D. L. L. X., González-Alatorre, G., & Escamilla-Silva, E. M. (2005). Mathematical description of bikaverin production in a fluidized bed bioreactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 683-688.
- Chavez-Parga, M., Gonzalez-Ortega, O., Negrete, M. D. L. L. X., Vallarino, I. G., Alatorre, G. G., & Escamilla-Silva, E. M. (2008). Kinetic of the gibberellic acid and bikaverin production in an *airlift* bioreactor. *Process Biochemistry*, 43(8), 855-860.
- Darken, M. A., Jensen, A. L., & Shu, P. (1959). Production of gibberellic acid by fermentation. *Applied microbiology*, 7(5), 301.
- Drandev, S., Penev, K. I., & Karamanev, D. (2016). Study of the hydrodynamics and mass transfer in a rectangular air-lift bioreactor. *Chemical Engineering Science*, 146, 180-188.

- Ertola, R., Yantorno, O., & Mignone, C. (1994). *Microbiología industrial. Washington: 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.
- Eshel, D., Ben-Arie, R., Dinoor, A., & Prusky, D. (2000). Resistance of gibberellin-treated persimmon fruit to *Alternaria alternata* arises from the reduced ability of the fungus to produce endo-1, 4- $\beta$ -glucanase. *Phytopathology*, 90(11), 1256-1262.
- Foster, L. B., & Dunn, R. T. (1973). Stable reagents for determination of serum triglycerides by a colorimetric Hantzsch condensation method. *Clinical Chemistry*, 19(3), 338-340.
- Foury, C. (1977). Trials on gibberellic acid application to a spring crop of globe artichoke (*Cynara scolymus*) cv. Blanc Hyerois. In *Annales de L'Amelioration des Plantes* (Vol. 27, No. 4, pp. 411-426).
- Garbayo, I., VÍ, C., Nava-Saucedo, J. E., & Barbotin, J. N. (2003). Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme and microbial technology*, 33(5), 629-634.



- García, S. M., Firpo, I. T., Anido, F. S. L., & Cointry, E. L. (1999). Application of gibberellic acid in globe artichoke. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 34(5), 789-793.
- Giordano, W., & Domenech, C. E. (1999). Aeration affects acetate destination in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS microbiology letters*, 180(1), 111-116.
- González-Rossia, D., Juan, M., Reig, C., & Agustí, M. (2006). The inhibition of flowering by means of gibberellic acid application reduces the cost of hand thinning in Japanese plums (*Prunus salicina* Lindl.). *Scientia horticulturae*, 110(4), 319-323.
- Hedden, P., & Sponsel, V. (2015). A century of gibberellin research. *Journal of plant growth regulation*, 34(4), 740-760.
- Hedden, P. (2012). Gibberellin biosynthesis. *eLS*.
- Homann, V., Mende, K., Arntz, C., Ilardi, V., Macino, G., Morelli, G., & Tudzynski, B. (1996). The isoprenoid pathway: cloning and characterization of fungal FPPS genes. *Current genetics*, 30(3), 232-239.
- Hook, J. M., Mander, L. N., & Urech, R. (1980). Total synthesis of gibberellic acid. The hydrofluorene route. *Journal of the American Chemical Society*, 102(21), 6628-6629.
- Hori, S. (1898). Some observations on “*Bakanae*” disease of the rice plant. *Mem Agric Res Sta (Tokyo)*, 12, 110-119.
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. *Fisiología vegetal. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.[Links]*.
- Juarez C y Rochín LC. 1966. Manual de Química Aplicada. Imprenta Arana, S.A.

- Karakoç, Ş., & Aksöz, N. (2006). Some Optimal Cultural Parameters for Gibberellic Acid Biosynthesis by *Pseudomonas* sp. *Turkish Journal of Biology*, 30(2), 81-85.
- Kinay, P., Yildiz, F., Sen, F., Yildiz, M., & Karacali, I. (2005). Integration of pre- and postharvest treatments to minimize *Penicillium* decay of Satsuma mandarins. *Postharvest Biology and Technology*, 37(1), 31-36.
- Kumar, P. K. R., & Lonsane, B. K. (1989). Microbial production of gibberellins: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol*, 34, 29-139.
- Lee J.M. 1992. Biochemical Engineering. Ed. Prentice Hall. United States of America.
- Ludford, P. M. (2003). Hormonal changes during postharvest. *Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker-*, 31-78.
- Martinez-Torres KS. 2014. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química: Producción de ácido giberélico utilizando fuente de carbono mixta glucosa-aceite bajo condiciones limitadas de nitrógeno. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Marwick, J. D., Wright, P. C., & Burgess, J. G. (1999). Bioprocess intensification for production of novel marine bacterial antibiotics through bioreactor operation and design. *Marine Biotechnology*, 1(5), 495-507.
- Mathews, J. H., & Fink, K. D. (2004). Numerical optimization. *Numerical Methods Using MATLAB*, 376-388.
- Mende, K., Homann, V., & Tudzynski, B. (1997). The geranylgeranyl diphosphate synthase gene of *Gibberella fujikuroi*: isolation and expression. *Molecular and General Genetics MGG*, 255(1), 96-105.
- Monteiro-Machado, C. M., & Soccol, C. R. (2007). Gibberellic acid production, Chapter 13. *Current Developments in Solid-State Fermentation*, 277-301.

- Otmani, M., Coggins Jr, C. W., Agustí, M., & Lovatt, C. J. (2000). Plant growth regulators in citriculture: world current uses. *Critical reviews in plant sciences*, 19(5), 395-447.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology advances*, 22(3), 189-259.
- Quijano-Ortiz DG. 2015. Tesis de Maestría: Efecto de Una Fuente de Carbono Mixta sobre La Producción de Ácido Giberélico en Cultivo Sumergido con *Gibberella fujikuroi* bajo Condiciones Limitadas de Nitrógeno. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Rademacher, W. (1994). Gibberellin formation in microorganisms. *Plant growth regulation*, 15(3), 303-314.
- Ramos-Lozano AS. 2015. Producción de ácido giberélico 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.
- Rios-Irbe, E. Y., Flores-Cotera, L. B., Chávira, M. M. G., González-Alatorre, G., & Escamilla-Silva, E. M. (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(6), 1499-1505.
- Rios-Irbe, E. Y., Hernández-Calderón, O. M., Reyes-Moreno, C., Contreras-Andrade, I., Flores-Cotera, L. B., & Escamilla-Silva, E. M. (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(5), 1169-1180.

- Robinson, T., Singh, D., & Nigam, P. (2001). Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(3), 284-289.
- Rodrigues, C., Vandenberghe, L. P. D. S., de Oliveira, J., & Soccol, C. R. (2012). New perspectives of gibberellic acid production: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 32(3), 263-273.
- Sánchez-Fernández, R., Avalos, J., & Cerdá-Olmedo, E. (1997). Inhibition of gibberellin biosynthesis by nitrate in *Gibberella fujikuroi*. *FEBS letters*, 413(1), 35-39.
- Sawada, K. (1912). Diseases of agricultural products in Japan. *Formosan Agricultural Review*, 63, 10-16.
- Schrader, W. (1994). Growth regulator gives earlier harvest in artichokes. *California agriculture*, 48(3), 29-32.
- Shukla, R., Chand, S., & Srivastava, A. K. (2005). Improvement of gibberellic acid production using a model based fed-batch cultivation of *Gibberella fujikuroi*. *Process biochemistry*, 40(6), 2045-2050.
- Shukla, R., Srivastava, A. K., & Chand, S. (2003). Bioprocess strategies and recovery processes in gibberellic acid fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(5), 269-278.
- Silva, E. E., Dendooven, L., Reynell, J. U., Ramírez, A. M., Alatorre, G. G., & de la Torre Martínez, M. (1999). Morphological development and gibberellin production by different strains of *Gibberella fujikuroi* in shake flasks and bioreactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(6), 753-755.

- Solorzano, L. (1969). *Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. Universidad de Estadual da Paraíba* (Doctoral dissertation, Dissertação de Mestrado).
- Southwick, S. M., Yeager, J. T., & Zhou, H. (1995). Flowering and fruiting in 'Patterson' apricot (*Prunus armeniaca*) in response to postharvest application of gibberellic acid. *Scientia horticulturae*, 60(3), 267-277.
- Spížek, J., & Tichý, P. (1995). Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Folia microbiologica*, 40(1), 43-50.
- Takahashi, J. A., Teles, A. P. C., Bracarense, A. D. A. P., & Gomes, D. C. (2013). Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi. *Phytochemistry reviews*, 12(4), 773-789.
- Taylor, B. H., & Geisler-Taylor, D. (1998). Flower Bud Thinning and Winter Survival of Red haven and Crest haven Peach in Response to GA<sub>3</sub> Sprays. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(4), 500-508.
- Tudzynski, B., & Höltter, K. (1998). Gibberellin Biosynthetic Pathway in *Gibberella fujikuroi*: Evidence for a Gene Cluster. *Fungal genetics and biology*, 25(3), 157-170.
- Tudzynski, B. (2005). Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(6), 597-611.
- Tudzynski, B. (2014). Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in microbiology*, 5.
- Woitek, S., Unkles, S. E., Kinghorn, J. R., & Tudzynski, B. (1997). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene of *Gibberella fujikuroi*: isolation and characterization. *Current genetics*, 31(1), 38-47.

- Yabuta, T., Sumiki, Y., Aso, K., Tamura, T., Igarashi, H., & Tamari, K. (1941). Biochemistry of the “*Bakanae*” fungus of rice. Part 10. The chemical constitution of gibberellin 1. *J. agric. chem. Soc. Japan*17, 721-730.
- Young, M. A., Carbonell, R. G., & Ollis, D. F. (1991). *Airlift* bioreactors: Analysis of local two-phase hydrodynamics. *AIChE journal*, 37(3), 403-428.
- Yu, T., Wu, P. G., Qi, J. J., Zheng, X. D., Jiang, F., & Zhan, X. (2006). Improved control of postharvest blue mold rot in pear fruit by a combination of *Cryptococcus laurentii* and gibberellic acid. *Biological Control*, 39(2), 128-134.

## XI. ANEXOS

### APÉNDICE A: Preparación de reactivos

A continuación se presenta una descripción a detalle sobre cómo preparar los reactivos utilizados para la cuantificación de los sustratos presentes en el medio de cultivo a cada tiempo de muestreo.

#### 1. Determinación de glucosa

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

Solución madre de glucosa a  $1 \text{ g L}^{-1}$

Se disolvieron 0.1 g de glucosa en 100 mL de agua destilada.

Reactivo de Miller

- 10 g de hidróxido de sodio (NaOH)
- 2 g de fenol ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ )
- 0.5 g de sulfito de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )
- 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ( $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$ )

Se disolvió el hidróxido de sodio en aproximadamente 800 mL de agua destilada, posteriormente se agregó uno a uno los reactivos restantes y se aforó a 1 L con agua destilada.

Sal de Rochelle

- 30 g de tartrato de sodio y potasio

Disolver completamente el tartrato de sodio y potasio en 40 mL de agua destilada caliente, y una vez fría la solución aforar a 100 mL.

## 2. Determinación de glicerol

Para la cuantificación de este compuesto se requirió de la preparación de los siguientes reactivos:

Solución madre de glicerol a  $12.50 \text{ mmol L}^{-1}$

Disolver en agua destilada 1.1514 g de glicerol y aforar a 1 L.

Metaperyodato de Sodio

- 77 g de acetato de amonio anhidro ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ )
- 60 mL de ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )
- 650 mg de metaperyodato de sodio ( $\text{NaIO}_4$ )

Disolver el acetato de amonio anhidro en aproximadamente 700 mL de agua destilada, posteriormente añadir el ácido acético glacial y el metaperyodato de sodio. Disolver y diluir para 1 L con agua destilada. La solución es estable por al menos 6 meses a temperatura laboratorio.

Acetilacetona

- 0.75 mL de acetilacetona ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ )
- 19.25 mL de isopropanol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ )

Añadir la acetilacetona al alcohol y mezclar bien. Añadir 80 mL de agua destilada y mezclar. La solución es estable por al menos 6 meses a temperatura ambiente. Almacenar en frasco ámbar.

## 3. Determinación de nitrógeno

Para la cuantificación de nitrógeno amoniacal se requirió de la preparación de los siguientes reactivos:

Solución madre de cloruro de amonio a 5 mM

- 0.2675 g de ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )



Disolver en agua destilada la sal, previamente secada en estufa a 90 °C durante 4 horas, la solución se diluyó a 1 L.

#### Solución A

Disolver 4 g de fenol en 500 mL de etanol absoluto. Esta solución es estable a temperatura ambiente.

#### Solución B

Pesar 0.375 g de nitroprusiato de sodio y disolver en 500 mL de agua destilada en un matraz aforado. Almacenar en un envase de plástico oscuro. La solución es estable durante una semana.

#### Solución C

Pesar 15 g de citrato de sodio tribásico hidratado y 0.8 g de NaOH; disolver y aforar a 1 L con agua destilada. La solución es estable.

#### Solución D

- 8 mL de hipoclorito (blanqueador marca cloralex)
- 92 mL de solución C

Disolver y aforar el hipoclorito (cloralex) con la solución alcalina C. Se debe preparar justo antes de usar.

### **4. Cuantificación de fosfatos**

Para la determinación de fosfatos se requirió de la preparación de los siguientes reactivos.

Solución madre de fosfato a 500 mg L<sup>-1</sup>

- 0.7165 g de (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Disolver en agua destilada el fosfato de potasio monobásico, previamente secado en estufa a 90°C durante 4 horas; la disolución se diluyó a 1 L.

Solución de ácido concentrado de molibdato de amonio

- 31.4 g de molibdato de amonio
- 252 mL de ácido sulfúrico concentrado
- 3.4 mL de ácido nítrico concentrado

Disolver 31.4 g de molibdato de amonio en 200 mL de agua destilada. En 400 mL de agua destilada se agrega cuidadosamente 252 mL de ácido sulfúrico concentrado, se deja resbalar por las paredes del matraz aforado. Dejar enfriar la solución y agregar 3.4 mL de ácido nítrico concentrado. Finalmente agregar la solución de molibdato de amonio y aforar a 1000 mL.

Solución de ácido amino-naftol-sulfónico

- 0.75 g de ácido amino-naftol-sulfónico
- 42 g de sulfito de sodio anhidro
- 70 g de metabisulfito de sodio

Pesar y disolver 42 g de sulfito de sodio anhidro y 70 g de metabisulfito de sodio anhidro en 900 mL de agua destilada; una vez disueltos, disolver 0.75 g de ácido amino-naftol-sulfónico finamente triturado y aforar a 1000 mL. Esta solución se debe guardar en frasco ámbar con tapón esmerilado a una temperatura no mayor a 30°C. Es estable 4 meses.

## 5. Cuantificación de GA<sub>3</sub>

Para la cuantificación de GA<sub>3</sub> se requiere preparar la siguiente solución:

Solución de HCl al 3.75 M.

- 155.08 mL de HCl.

Añadir lentamente el HCl (al 37.1 % y densidad 1.19 g mL<sup>-1</sup>) en 300 mL de agua destilada y luego aforar hasta un volumen de 500 mL.

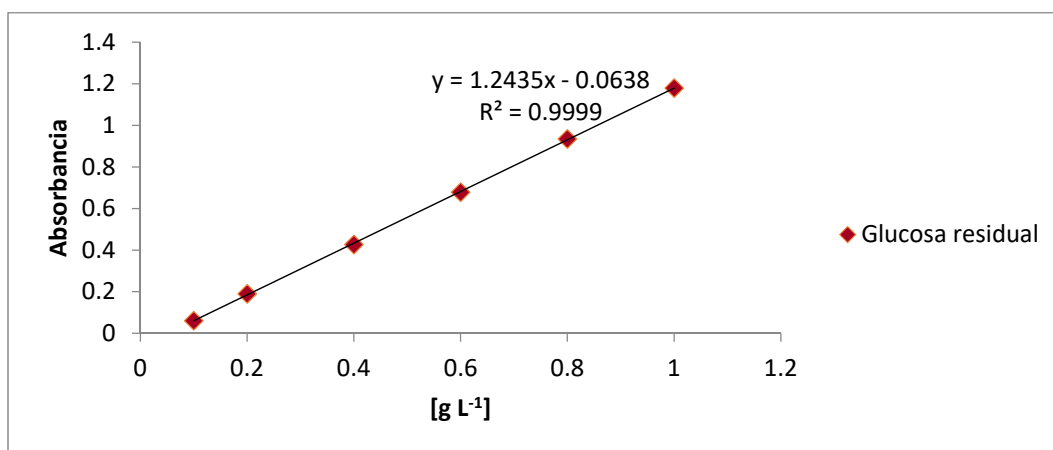
## Apéndice B: Curva de calibración

Es pertinente aclarar que las curvas que a continuación se presentan son solo un ejemplo; debido a que las curvas de calibración fueron realizadas cada vez que se prepararon reactivos nuevos, aunque los valores siempre fueron muy similares, debido a la reproductibilidad en la preparación de los reactivos y al uso del mismo equipo de medición.

### 1. Determinación de glucosa

**Cuadro 10.** Datos para la realización de la curva de calibración para determinar glucosa.

mg mL <sup>-1</sup>	A $\lambda=575\text{nm}$
0.1	0.061
0.2	0.19
0.4	0.427
0.6	0.679
0.8	0.935
1	1.18

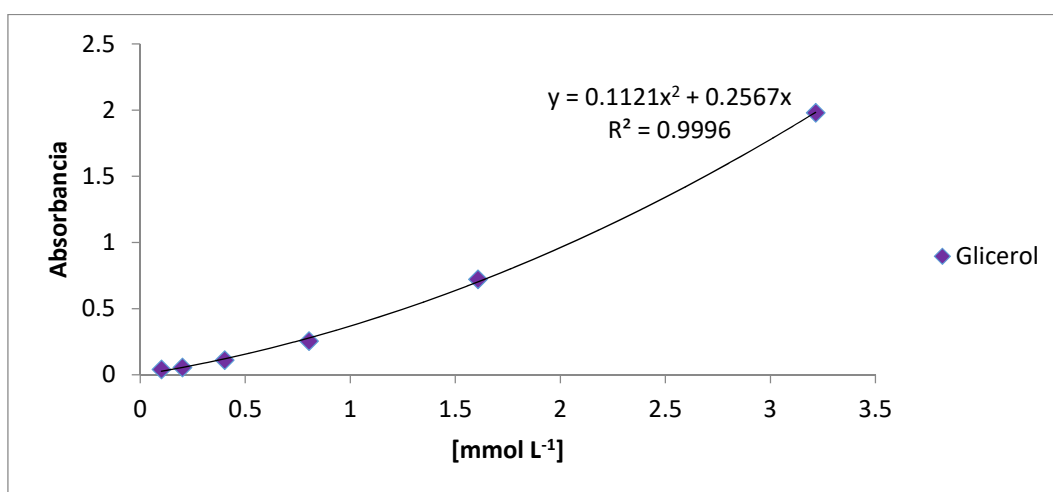


**Figura 22.** Curva de calibración para cuantificar el sustrato glucosa.

## 2. Determinación de glicerol

**Cuadro 11.** Datos para la realización de la curva de calibración para determinar glicerol.

$\text{mmol L}^{-1}$	$A_{\lambda=414\text{nm}}$
0.1004	0.041
0.2009	0.056
0.4018	0.112
0.803	0.255
1.6075	0.722
3.215	1.98

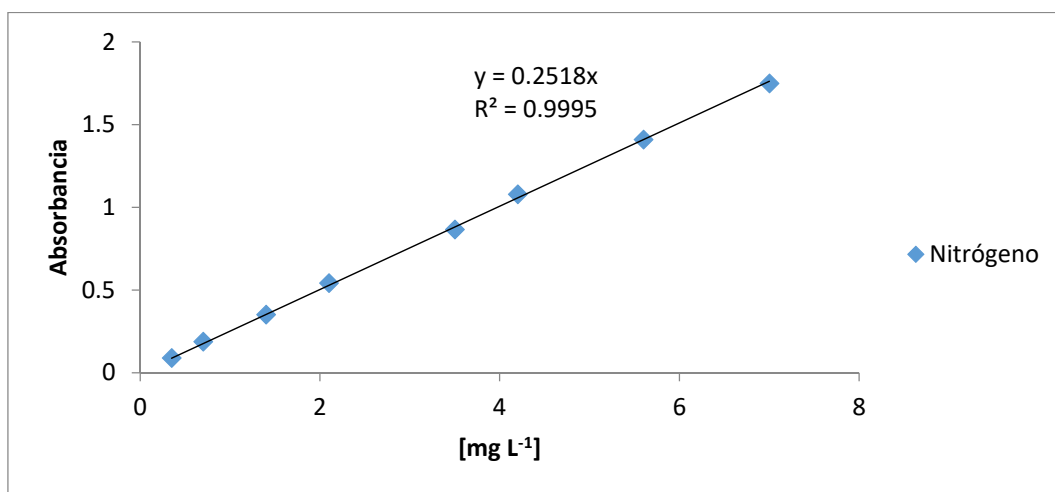


**Figura 23.** Curva de calibración para cuantificar glicerol.

### 3. Determinación de nitrógeno amoniacal

**Cuadro 12.** Datos para la construcción de la curva de calibración para determinar nitrógeno amoniacal.

$\text{mg L}^{-1}$	$A_{\lambda=662\text{nm}}$
0.35	0.09
0.7	0.189
1.4	0.352
2.1	0.543
3.5	0.867
4.2	1.08
5.6	1.41
7	1.75

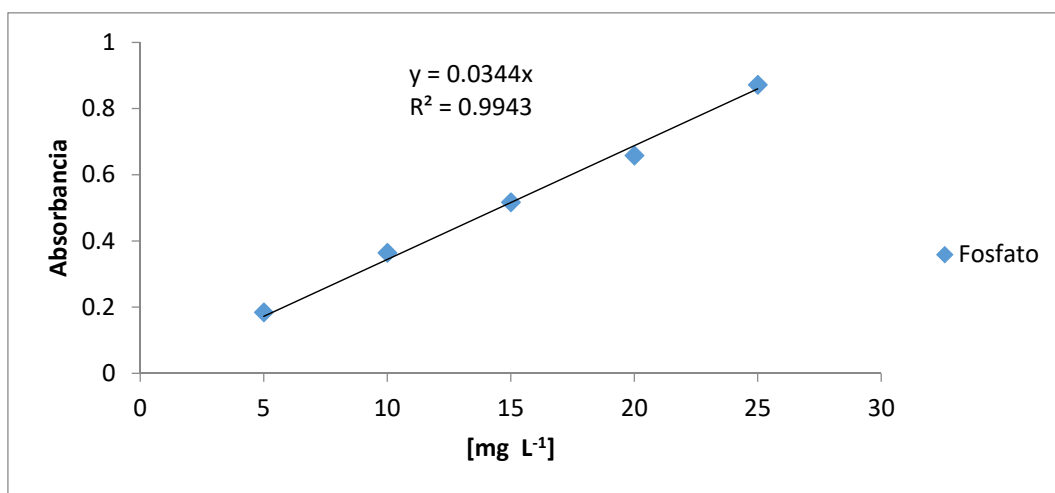


**Figura 24.** Curva de calibración empleada para la determinación de nitrógeno residual.

#### 4. Determinación de fosfatos

**Cuadro 13.** Datos para la construcción de la curva de calibración para determinar fosfatos.

$\text{mg L}^{-1}$	$A_{\lambda=690\text{nm}}$
5	0.184
10	0.364
15	0.517
20	0.658
25	0.872

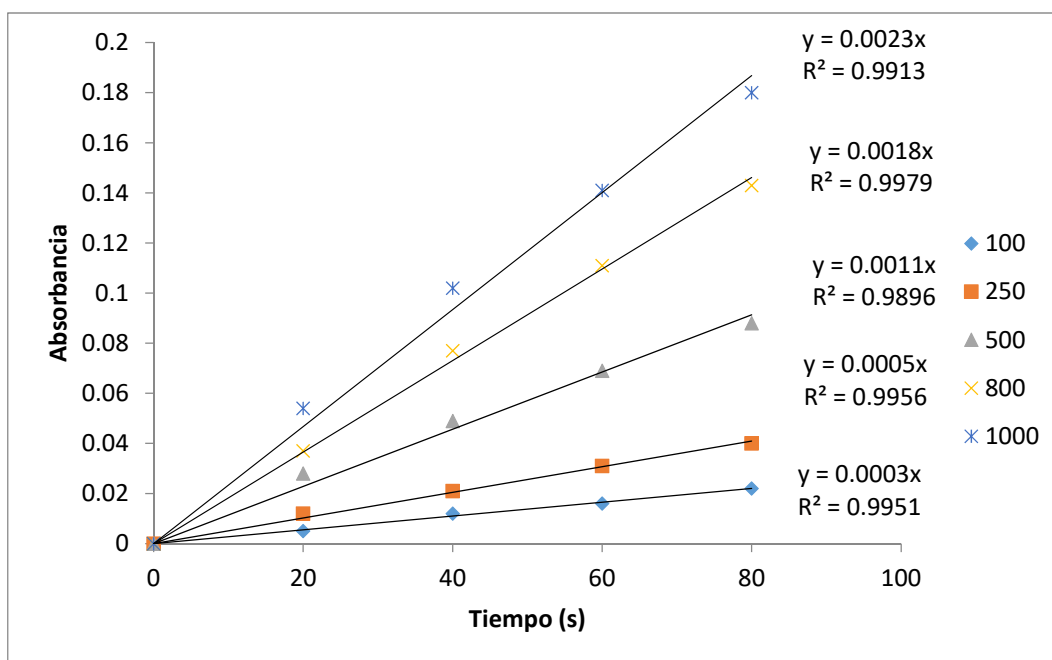


**Figura 25.** Curva de calibración utilizada para determinar fosfatos.

## 5. Cuantificación del ácido giberélico

**Cuadro 14.** Datos para la construcción de la curva de calibración para la medición del ácido giberélico.

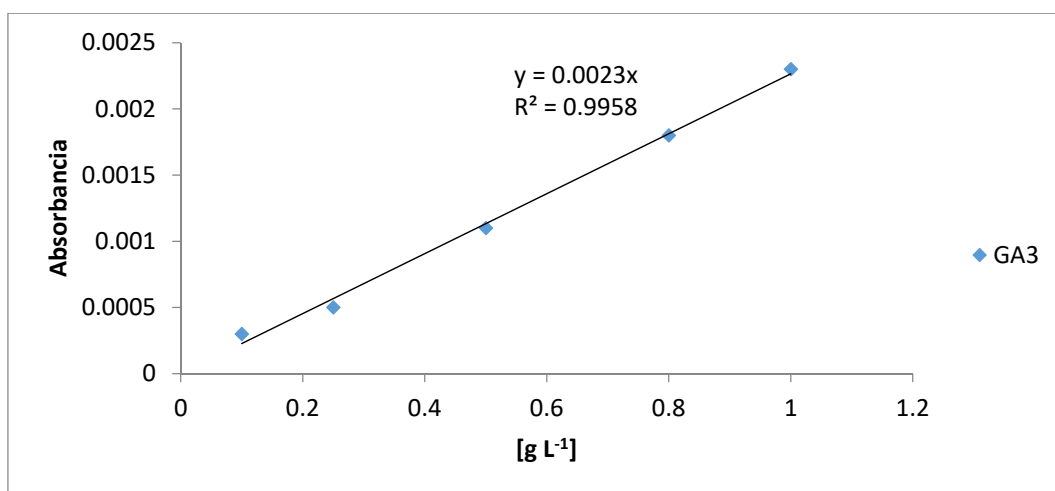
Tiempo (s)	100 mg L <sup>-1</sup>	250 mg L <sup>-1</sup>	500 mg L <sup>-1</sup>	800 mg L <sup>-1</sup>	1000 mg L <sup>-1</sup>
0	0	0	0	0	0
20	0.005	.012	.028	0.037	0.054
40	.012	0.021	0.049	0.077	0.102
60	.016	0.031	0.069	0.111	0.141
80	.022	.04	0.088	0.143	0.18



**Figura 26.** Gráfica para obtener las pendientes para la realización de la curva.

**Cuadro 15.** Pendientes para la realización de la curva de calibración para determinar ácido giberélico.

mg L <sup>-1</sup>	Pendiente
100	0.0003
250	0.0005
500	0.0011
800	0.0018
1000	0.0023



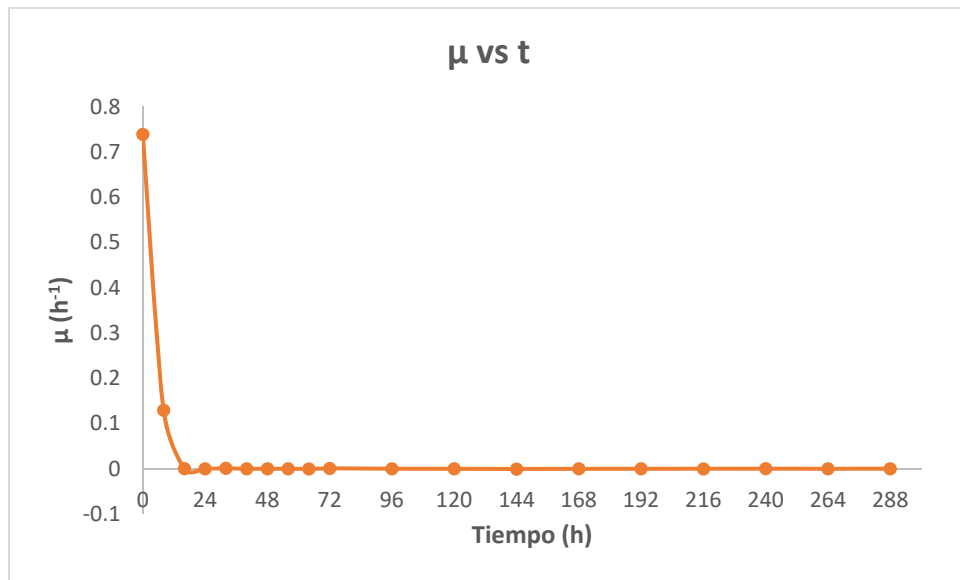
**Figura 27.** Curva de calibración para la determinación de ácido giberélico.



**Apéndice C: Datos de velocidad específica de crecimiento del modelo  
logístico**

**Cuadro 16.** Datos de  $\mu$  vs  $t$  para el experimento donde se utilizó la fuente mixta de carbono.

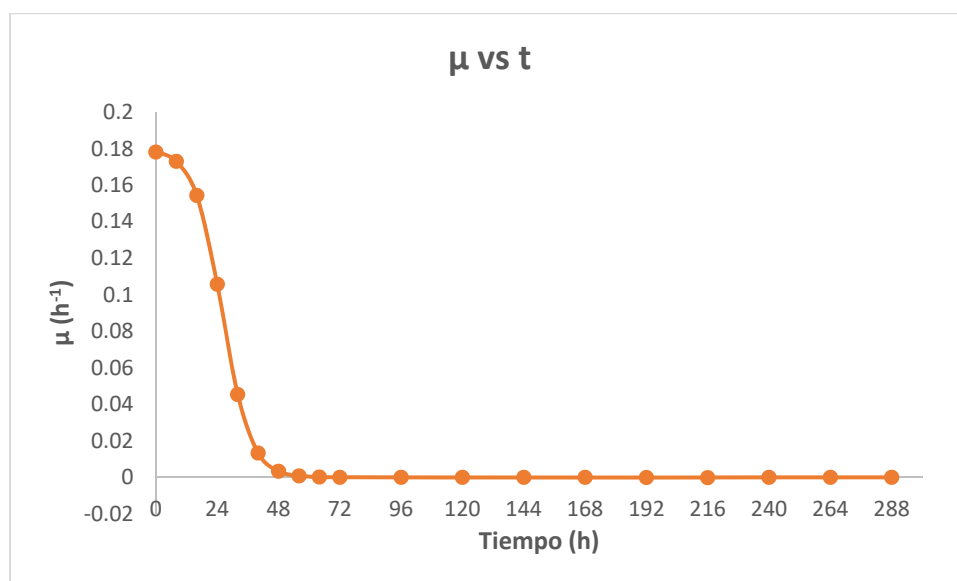
<b>t (h)</b>	<b><math>\mu</math></b>	<b>t (h)</b>	<b><math>\mu</math></b>	<b>t (h)</b>	<b><math>\mu</math></b>
0	0.7392	56	0	192	-0.0001
8	0.1295	64	-0.0003	216	-0.0003
16	0.0003	72	0.0007	240	0.0002
24	-0.0001	96	-0.0001	268	-0.0001
32	0.0009	120	0	288	0.0001
40	0	144	-0.0006		
48	-0.0001	168	0.0001		



**Figura 28.** Gráfica de la velocidad específica de crecimiento contra el tiempo para el experimento donde se utilizó la fuente mixta de carbono.

**Cuadro 17.** Datos de  $\mu$  vs t para el experimento donde se utilizó glucosa como fuente de carbono.

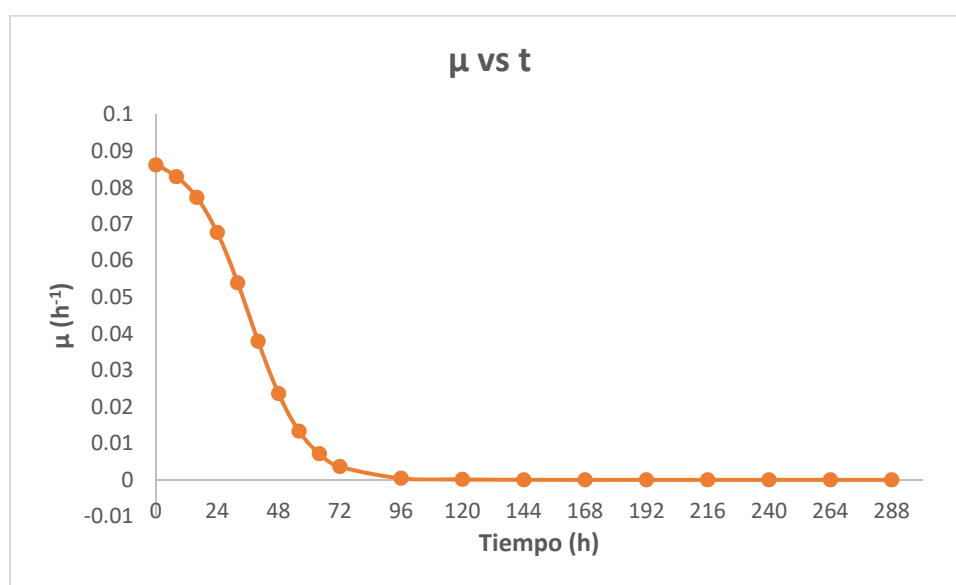
t (h)	$\mu$	t (h)	$\mu$	t (h)	$\mu$
0	0.1781	56	0.0008	192	-0.0001
8	0.173	64	0.0002	216	-0.0002
16	0.1543	72	0	240	0
24	0.1057	96	0	268	0
32	0.0454	120	0	288	0
40	0.0133	144	0		
48	0.0033	168	0		



**Figura 29.** Gráfica de la velocidad específica de crecimiento contra el tiempo para el experimento donde se utilizó glucosa como fuente de carbono.

**Cuadro 18.** Datos de  $\mu$  vs t para el experimento donde se utilizó glicerol como fuente de carbono.

t (h)	$\mu$	t (h)	$\mu$	t (h)	$\mu$
0	0.0862	56	0.0133	192	0
8	0.083	64	0.0071	216	0
16	0.0773	72	0.0036	240	0
24	0.0677	96	0.0004	268	0
32	0.0539	120	0.0001	288	0
40	0.0379	144	0		
48	0.0236	168	0		



**Figura 30.** Gráfica de la velocidad específica de crecimiento contra el tiempo para el experimento donde se utilizó glicerol como fuente de carbono.

## ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados celsius
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>atm</b>	Atmosfera
<b>g</b>	Gramos
<b>GA<sub>3</sub></b>	Ácido giberélico
<b>GAs</b>	Giberelinas
<b>h</b>	Hora
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>kg</b>	Kilogramos
<b>L</b>	Litro
<b>mbar</b>	Milibar
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min.</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm</b>	Milímetros

<b>mmol</b>	Milimoles
<b>nm</b>	Nanometros
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>vvm</b>	Volumen de aire por volumen de medio por minuto