

# Universidad Autónoma de Querétaro

## Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República  
(PROPAC)

Doctorado en Ciencias de los Alimentos

EFFECTO INDUCTIVO QUE EJERCE UNA FUENTE DE CARBONO MIXTA  
EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR *Gibberella fujikuroi*

### Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M.C. Erika Yudit Rios Iribe

Dirigida por:

Dr. Eleazar M. Escamilla Silva

### SINODALES

Dr. Eleazar M. Escamilla Silva

Presidente

Dr. Carlos Regalado González

Secretario

Dr. Mario M. González Chavira

Vocal

Dr. Ramón G. Guevara González

Suplente

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

Suplente

Q.B. Magali E. Aguilar Ortíz

Directora Facultad de Química

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval

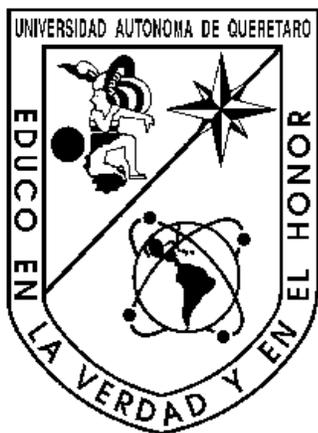
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Enero 2011

México



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Efecto inductivo que ejerce una fuente de carbono mixta en la producción de ácido giberélico por *Gibberella fujikuroi*

T e s i s

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta

M.C. Erika Yudit Rios Iribe

Santiago de Querétaro, Qro., Marzo de 2011

## RESUMEN

El ácido giberélico ( $GA_3$ ) es el principal metabolito secundario producido por fermentación del hongo *Gibberella fujikuroi*. Esta fitohormona tiene gran importancia en la agricultura e industria cervecera. En esta investigación, una mezcla glucosa-aceite de maíz fue usada en tres diferentes proporciones sobre la base de  $40 \text{ g L}^{-1}$  de carbono en un biorreactor de tanque agitado de capacidad 7 L para la producción de  $GA_3$  por *G. fujikuroi*. A través del tiempo de cultivo, fueron mantenidos y controlados los valores de pH 3.5, temperatura  $29 \text{ }^\circ\text{C}$ , agitación 600 rpm y aireación 1 vvm. El metabolismo secundario inició entre las 48 y 60 horas de cultivo y la máxima producción de  $GA_3$  se encontró a las 288 h para los tres tratamientos propuestos con fuente de carbono mixta. Se cuantificó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) una producción de  $430 \text{ mg L}^{-1}$  de  $GA_3$  cuando se utilizó la proporción 1:2 glucosa-aceite de maíz;  $380 \text{ mg L}^{-1}$  de  $GA_3$  cuando se ensayó la proporción 1:1 glucosa-aceite de maíz; en contraste a los  $280 \text{ mg L}^{-1}$  cuando se utilizó la proporción que contenía la mayor cantidad de glucosa (proporción 2:1). Por otro lado, se obtuvieron  $358 \text{ mg L}^{-1}$  cuando se utilizó aceite como única fuente de carbono; y al emplear solo glucosa, el metabolismo secundario inició a las 96 h de cultivo obteniendo la máxima concentración de  $136 \text{ mg L}^{-1}$  de  $GA_3$  a las 264 h de fermentación, siendo así, la menor cantidad de  $GA_3$  producida durante todas las fermentaciones realizadas. Se concluyó que la fuente de carbono afecta el tiempo de fermentación así como la producción del metabolito. *G. fujikuroi* mostró gran capacidad para adaptarse a medios de cultivo con aceite de maíz como fuente de carbono, realizando una rápida metabolización de los ácidos grasos (los cuales fueron cuantificados por Cromatografía de Gases). Por tanto, la glucosa no ejerce ningún efecto de represión catabólica sobre la asimilación del aceite de maíz, o alguna clase de control metabólico sobre el transporte de los ácidos grasos en las células de *G. fujikuroi* cuando se utiliza fuente de carbono mixta.

(Palabras clave: ácido giberélico, fuente de carbono mixta, *Gibberella fujikuroi*)

## SUMMARY

Gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) is the chief secondary metabolite produced by fermentation of the *Gibberella fujikuroi* fungus. This phytohormone is of great importance in agriculture and in the brewing industry. In this research, a glucose-corn oil mixture was used in three different proportions on the basis of 40 g L<sup>-1</sup> of carbon in a 7 L stirred tank bioreactor for the production of GA<sub>3</sub> by *G. fujikuroi*. Throughout the culture time, the values of pH 3.5, 29 °C temperature, 600 rpm agitation and 1 vvm aeration were maintained and controlled. The secondary metabolism began between 48 and 60 hours of culture, and the maximum production of GA<sub>3</sub> was found at 288 h for the three treatments proposed with a mixed carbon source. A production of 430 mg of GA<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> was quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) when using the glucose-corn oil ratio 1:2; 380 mg GA<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> when the glucose-corn oil ratio was 1:1; in contrast to 280 mg L<sup>-1</sup> when the proportion that contained the largest amount of glucose (ratio 2:1) was used. We obtained 358 mg L<sup>-1</sup> when oil was used as the sole carbon source; when only glucose was used, the secondary metabolism began at 96 h of culture, obtaining the highest concentration of 136 mg GA<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> at 264 h of fermentation, this being the least amount of GA<sub>3</sub> produced during all fermentations performed. Our conclusion is that the carbon source affected the fermentation time as well as the production of the metabolite. *G. fujikuroi* showed a great ability to adapt to culture media with corn oil as a carbon source, resulting in a rapid metabolism of fatty acids (which were quantified by Gas Chromatography). Therefore, glucose does not exert any catabolic repression on the assimilation of corn oil, or any kind of metabolic control on the transport of fatty acids in the cells of *G. fujikuroi* when using a mixed carbon source.

**(Key words:** Gibberellic acid, mixed carbon source, *Gibberella fujikuroi*)

## DEDICATORIA

A mi esposo e hijo

A ustedes por la felicidad compartida y apoyo incondicional

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor, el Dr. Escamilla, por creer en mí, brindarme confianza, apoyo y amistad.

A mis sinodales, por formar parte de la comisión revisora y compartir su conocimiento y comentarios constructivos que fueron valiosos para el desarrollo y culminación de este proyecto de investigación. Aquí por supuesto incluyo al Dr. Ramón Martínez Peniche, al cual agradecemos su activa colaboración.

A CONACyT por beneficiarme con la beca de posgrado, lo cual hizo posible una vida decorosa durante los estudios de doctorado.

A los proyectos 2004-C01-77 y 2141.09-P financiados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación Secretaría Agropecuaria (SAGARPA) y Dirección General de Estudios Superiores Tecnológicos (DGEST) respectivamente, a través de los cuales se otorgó el apoyo económico para la adquisición de equipo y material de laboratorio para la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por otorgarme su confianza al incorporarme en el programa de formación de Doctores Jóvenes.

A todo el personal administrativo y docente del Programa de Doctorado en Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Química-Universidad Autónoma de Querétaro, por haberme ayudado a solucionar todas las inquietudes y dificultades referentes al posgrado.

A todo el personal que formó parte del departamento de ingeniería Química, de los laboratorios de Biotecnología y Bioingeniería, Análisis Instrumental y

Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Celaya, durante el desarrollo de esta investigación y me permitieron el acceso a sus instalaciones y equipos.

A mis alumnas, compañeros y amigos: Irma, Tony, Polo, Linda, Itzel, Paz, Zully, Angela, Sanny, José, Juan, Gil, Silvia, Lupita, Sandra, Poncho, Xochitl, Don Martín, Erika, Jerry, Edgar, Valente, Mayra, gracias por esos momentos inolvidables de diversión, frustración y coraje que pasamos juntos generadores de grandes anécdotas.

A mis padres y hermanos, por confiar en mí y sentirse orgullosos de mí persona.

A ti mi chiquito, te agradezco tu madurez y fortaleza. Gracias por esas risas, besos y abrazos que me regalas, son energía para mi persona.

A ti mi amor, por ser parte de este logro profesional y haberme ayudado con la elaboración y discusión del proyecto, por brindarme tu apoyo incondicional sin el cual no hubiera sido posible la culminación de este trabajo de tesis doctoral.

A Dios, por darme la oportunidad de obtener un logro profesional más y fortaleza para soportar los sacrificios realizados.

**A TODOS GRACIAS**

# ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1. Historia	3
2.2. Generalidades	3
2.3. Propiedades físicas, químicas y biológicas de las giberelinas	4
2.4. Producción de ácido giberélico	6
2.5. Aplicaciones comerciales	7
2.6. Metabolismo secundario microbiano	10
2.7. Ruta biosintética de las giberelinas en <i>Gibberella fujikuroi</i>	13
2.8. Formas de obtención de las giberelinas	17
2.8.1. Síntesis química	17
2.8.2. Extracción de plantas	17
2.8.3. Fermentación microbiana	17
2.9. Proceso de fermentación	18
2.9.1. Cultivo sumergido	19
2.9.2. Microorganismo productor	19
2.9.3. Biorreactor	20
2.9.4. Condiciones de cultivo	21

2.9.5. Componentes del medio de cultivo (nutrientes)	21
2.9.5.1. Macronutrientes	22
2.9.5.1.1. Fuente de carbono y nitrógeno	22
2.9.5.1.2. Otros macronutrientes	24
2.9.5.2. Micronutrientes	24
2.9.6. Temperatura	25
2.9.7. pH	25
2.9.8. Aireación	25
2.9.9. Mezclado	26
2.10. Crecimiento microbiano	26
2.11. Acetil-CoA: nodo metabólico común en la biosíntesis de lípidos y giberelinas	29
III. JUSTIFICACIÓN	32
IV. HIPÓTESIS	32
V. OBJETIVOS	33
5.1. Objetivo general	33
5.2. Objetivos específicos	33
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1. Material biológico	34
6.2. Métodos	34
6.2.1. Preparación de medios de cultivo	34
6.2.2. Mantenimiento de la cepa	36
6.2.3. Condiciones de cultivo	36
6.2.4. Toma de muestra	37
6.2.5. Determinación de aceite	38
6.2.6. Determinación de biomasa	39
6.2.7. Cuantificación de glucosa	40

6.2.8. Determinación de fosfatos	40
6.2.9. Determinación de nitrógeno	41
6.2.10. Cuantificación de glicerol	42
6.2.11. Cuantificación del ácido giberélico	42
6.2.12. Cuantificación de los ácidos grasos libres	44
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
7.1. Fermentación a nivel reactor para producción de GA <sub>3</sub>	46
7.2. Experimentos control	52
7.3. Producción de GA <sub>3</sub>	57
7.4. Estudios genéticos en <i>Gibberella fujikuroi</i> por nuestro grupo de trabajo	59
7.5. Análisis y cuantificación de ácidos grasos por Cromatografía de Gases	60
7.6. Evaluación del efecto de la glucosa sobre la asimilación de ácidos grasos	63
7.7. Consumos acumulados de los ácidos grasos	65
VIII. CONCLUSIONES	69
IX. BIBLIOGRAFÍA	71
APÉNDICE A: Preparación de reactivos	79
APÉNDICE B: Curvas de calibración	84
APÉNDICE C: Análisis estadístico	99
APÉNDICE D: Artículo aceptado para publicación	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Estructura de las giberelinas	5
2. Estructura química del GA <sub>3</sub>	6
3. Formación de metabolitos secundarios durante la idiofase	11
4. Ruta biosintética de las giberelinas en <i>Gibberella fujikuroi</i>	15
5. Rutas biosintéticas 3β-nohidroxilada y 3β-hidroxilada para la síntesis de giberelinas	16
6. Curva característica de crecimiento y consumo de sustrato en un cultivo por lote	27
7. Acetil-CoA: intermediario central del metabolismo oxidativo	30
8. Acetil-CoA precursor para la biosíntesis de ácido giberélico, ácidos grasos, fusarina C y bikaverina. Se muestran también algunas fuentes de acetil-CoA	31
9. Biorreactor de tanque agitado utilizado durante los experimentos	38
10a. Producción de GA <sub>3</sub> utilizando la proporción 1:1 glucosa/aceite de maíz en el medio de cultivo	47
10b. Cinéticas de producción de biomasa, consumo de nitrógeno y consumo de fosfato utilizando la proporción 1:1 glucosa/aceite con <i>G. fujikuroi</i>	47
11a. Producción de GA <sub>3</sub> utilizando la proporción 2:1 glucosa/aceite en el medio de cultivo	48
11b. Cinéticas de producción de biomasa, consumo de nitrógeno y consumo de fosfato utilizando la proporción 2:1 glucosa/aceite con <i>G. fujikuroi</i>	48
12a. Producción de GA <sub>3</sub> utilizando la proporción 1:2 glucosa/aceite	49
12b. Cinéticas de producción de biomasa, consumo de nitrógeno y consumo de fosfato utilizando la proporción 1:2 glucosa/aceite con <i>G. fujikuroi</i>	49
13a. Producción de GA <sub>3</sub> utilizando glucosa como fuente de carbono	53

FIGURA	PÁGINA
13b. Cinéticas de producción de biomasa, consumo de nitrógeno y consumo de fosfato utilizando glucosa como fuente de carbono para la producción de GA <sub>3</sub> por <i>G. fujikuroi</i>	53
14a. Producción de GA <sub>3</sub> utilizando aceite de maíz como fuente de carbono	56
14b. Cinéticas de producción de biomasa, consumo de nitrógeno y consumo de fosfato utilizando aceite de maíz como sustrato durante el cultivo con <i>G. fujikuroi</i>	56
15. Efecto de la utilización de distintas proporciones de fuente de carbono mixta sobre la producción de GA <sub>3</sub>	58
16. Evolución de los ácidos grasos libres durante el cultivo de <i>G. fujikuroi</i> : (a) proporción 1:1; (b) 2:1 y (c) 1:2 glucosa:aceite de maíz	62
17. Monitoreo de los ácidos grasos libres presentes durante la fermentación de <i>G. fujikuroi</i> utilizando solo aceite de maíz como fuente de carbono	63
18. Consumos acumulados de los ácidos grasos al utilizar la fuente de carbono mixta 1:1 (glucosa:aceite de maíz) durante la producción de GA <sub>3</sub>	66
19. Consumos acumulados de los ácidos grasos al utilizar la proporción de fuente de carbono mixta 2:1 (glucosa:aceite de maíz) durante la producción de GA <sub>3</sub>	67
20. Consumos acumulados de los ácidos grasos al utilizar la proporción de fuente de carbono mixta 1:2 (glucosa:aceite de maíz) por <i>G. fujikuroi</i>	67
21. Consumos acumulados de los ácidos grasos al utilizar aceite como fuente de carbono durante la producción de GA <sub>3</sub>	68
22. Curva de calibración para cuantificar el sustrato glucosa	84
23. Curva de calibración utilizada para determinar fosfatos	85
24. Curva de calibración empleada para la determinación de nitrógeno	86
25. Curva de calibración para cuantificar glicerol	87
26. Curva de calibración para la determinación de GA <sub>3</sub>	88

FIGURA	PÁGINA
27. Cromatograma de ácido giberélico a 1000 ppm	89
28. Cromatograma de ácido giberélico a 800 ppm	89
29. Cromatograma de ácido giberélico a 500 ppm	90
30. Cromatograma de ácido giberélico a 200 ppm	90
31. Cromatograma de ácido giberélico a 50 ppm	91
32. Cromatograma de la mezcla de ácidos grasos uno	92
33. Cromatograma de la mezcla de ácidos grasos dos	93
34. Cromatograma de la mezcla de ácidos grasos tres	93
35. Cromatograma de la mezcla de ácidos grasos cuatro	94
36. Cromatograma de la mezcla de ácidos grasos cinco	94
37. Curva de calibración para ácido palmítico	95
38. Curva de calibración para ácido esteárico	96
39. Curva de calibración para cuantificar ácido oleico	97
40. Curva de calibración para cuantificar ácido linoleico	98

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Algunos usos del GA <sub>3</sub> en la agricultura y horticultura	9
2. Ventajas y desventajas de algunos tipos de biorreactores	22
3. Esquema general del proceso de fermentación	35
4. Diseño experimental	37
5. Condiciones de operación para la cuantificación de GA <sub>3</sub> por HPLC	44
6. Análisis de varianza utilizando distintas proporciones de fuente de carbono mixta	51
7. Comparación de medias de GA <sub>3</sub> mediante la prueba de Tukey. Experimentos con fuente de carbono mixta	51
8. Comparación de medias de GA <sub>3</sub> mediante Dunnett. Experimentos con fuente de carbono mixta vs. experimento control donde se usó glucosa como fuente de carbono	54
9. Comparación de medias de GA <sub>3</sub> de experimentos con fuente de carbono mixta vs. control donde se usó aceite de maíz como fuente de carbono	55
10. Producción máxima de GA <sub>3</sub> durante el cultivo microbiano	58
11. Principal composición de los ácidos grasos del aceite de maíz	66
12. Datos para la realización de la curva de calibración para determinar glucosa	84
13. Datos para la construcción de la curva de calibración para determinar fosfatos	85
14. Datos para la construcción de la curva de calibración para determinar nitrógeno amoniacal	86
15. Datos para la realización de la curva de calibración para determinar glicerol	87
16. Datos obtenidos por HPLC para la construcción de la curva de calibración para GA <sub>3</sub>	88
17. Mezclas de ácidos grasos analizadas por CG para realizar las curvas de calibración	92

CUADRO	PÁGINA
18. Datos para la curva de calibración del ácido palmítico	95
19. Datos para la curva de calibración del ácido esteárico	96
20. Datos para la curva de calibración del ácido oleico	97
21. Datos para la curva de calibración del ácido linoleico	98

## I. INTRODUCCIÓN

Como todos los seres vivos, los microorganismos crecen, se reproducen y producen una variedad de compuestos bioquímicos, entre los cuales algunos son de interés para el hombre. Dentro de los productos microbianos de importancia económica, industrial y biotecnológica, se encuentran las giberelinas (GAs), producidas por el hongo *Gibberella fujikuroi*, las cuales tienen la capacidad de estimular el crecimiento de otros organismos vivos. Las GAs son un grupo importante de fitohormonas que regulan los diferentes procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas superiores, siendo su principal representante el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), el cual es el producto principal de la ruta biosintética de las GAs durante la fermentación de *G. fujikuroi* (Tudzynski, 1999).

Diversas investigaciones, han mostrado que la fuente de carbono usada en los procesos de fermentación microbiana para la producción de metabolitos secundarios, incide directamente en su rendimiento. Sin embargo, la mayoría de los procesos fermentativos, utilizan glucosa como fuente de carbono, debido a que la vía de la glicólisis está presente en una extensa variedad de organismos vivos, pero además por ser la ruta más rápida para satisfacer las necesidades energéticas de las células. La producción de GAs mediante *G. fujikuroi* no ha sido la excepción, la glucosa es la fuente de carbono más extensamente estudiada; incluso, la máxima producción reportada de ácido giberélico, utilizó a esta fuente de carbono (Escamilla y col., 2000). Sin embargo, la necesidad de mejorar la producción de las GAs, ha motivado la búsqueda de nuevas fuentes de carbono. La utilización de aceites naturales, se ha justificado en el hecho de que podrían poseer precursores naturales para la biosíntesis de GAs (Vass y Jefferys, 1979). Investigaciones realizadas en el Laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Celaya, utilizando aceites de ajonjolí, cártamo, maíz, arroz y girasol para la producción de GAs (Negrete-Rodríguez, 2002; Almanza-Rangel, 2005; Negrete-Rodríguez, 2007), indican que la utilización de aceites provenientes de plantas oleaginosas y gramíneas como fuente de carbono, incrementan la producción de GA<sub>3</sub> con respecto a la utilización de glucosa como fuente de carbono (Chávez-Parga, 2005; Chávez-Parga y col., 2007).

El presente proyecto de investigación, persiguió como objetivo principal, encontrar una estrategia alternativa para mejorar la producción de GA<sub>3</sub> por *G. fujikuroi*, utilizando una combinación glucosa-aceite como fuente de carbono durante el proceso fermentativo. Se espera con ello, un decremento en el tiempo de inicio en la producción de GA<sub>3</sub>, debido a la disponibilidad inmediata de los ácidos grasos y glicerol para el hongo. Así como, un aumento en la producción de la fitohormona; efecto positivo producido por el hecho de la mayor disponibilidad de acetyl-CoA en la célula para favorecer el metabolismo secundario.

## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1. Historia

La historia de las giberelinas (GAs) inicia en 1898 con una descripción científica del crecimiento anómalo de la planta de arroz conocida como enfermedad “bakanae” o “planta tonta”. Un síntoma temprano de la enfermedad es la super elongación de las plantas infectadas, sus tallos son delgados y pálidos, que al crecer rápidamente mueren. Es una de las enfermedades del arroz de los países del lejano oriente, especialmente de Japón. En 1926, la enfermedad se atribuyó a una toxina producida por un hongo, el cual se identificó como *Fusarium moniliforme* (etapa imperfecta), mas tarde clasificado como *Gibberella fujikuroi* (etapa perfecta, sexual) (Nakanishi, 1974). Este hongo recientemente fue llamado *Fusarium fujikuroi* (Shukla y col., 2005b). En 1935 Yabuta anunció el aislamiento de un estimulante del crecimiento del medio de cultivo del fitopatógeno. La sustancia fue llamada giberelina. Sin embargo, fue hasta 1956, cuando las GAs fueron encontradas en extractos de plantas superiores (Radley, 1956) y entonces definidas como hormonas naturales de plantas.

### 2.2. Generalidades

Algunas de estas GAs actúan como hormonas naturales regulando el crecimiento y desarrollo en plantas superiores, promoviendo procesos tales como germinación de semillas, elongación del tallo, expresión sexual, inducción de la floración y desarrollo del fruto (Brückner y Blechschmidt, 1991a; Woitek y col., 1997; Rojas y col., 2001). El efecto rápido y pronunciado de las GAs sobre los procesos antes mencionados, ha ganado mucha atención a nivel mundial y ha promovido su desarrollo como herramientas valiosas en la agricultura, cultivo de tejidos, viveros, invernaderos, jardines, horticultura, viticultura, industria cervecera, entre otros (Pape y Rehm, 1986; Kumar y Lonsane, 1990; Shukla y col., 2005b; Karakoc y Aksöz, 2006).

Las GAs presentan actividad significativa a concentraciones extremadamente bajas. Por tanto, las plantas superiores deben poseer un mecanismo eficaz para la percepción y transducción de la señal hormonal. Las

funciones que las GAs llevan a cabo en la planta, se pueden resumir brevemente resaltando los puntos más destacables (Pape y Rehm, 1986): incrementan el crecimiento en los tallos mediante la estimulación de tanto la división como la elongación celular (incrementa el número de células y la longitud de las mismas); inducen el crecimiento a través de una alteración en la distribución de calcio en los tejidos; interrumpen el periodo de latencia de las semillas, haciéndolas germinar (promueven la inducción de la actividad de enzimas hidrolíticas durante la germinación, esto es, activan la transcripción de genes que codifican enzimas hidrolíticas, como la  $\alpha$ -amilasa, que desdobla el almidón en azúcares, dando así alimento al organismo vegetal, y por tanto, haciendo que incremente su longitud); aceleran el desarrollo de plantas de lento crecimiento (promueven el rápido crecimiento de ciertas plantas en las fases en que resultan más propensas a las enfermedades); inducen la brotación de yemas; promueven el desarrollo de los frutos y retardan la maduración fisiológica de frutas, entre otras.

Como resultado de estas propiedades y sus aplicaciones comerciales, desde la mitad del siglo pasado, las GAs han sido objeto de diversos estudios. El enorme interés biotecnológico en la producción de GA<sub>3</sub> impulsó el estudio de la vía biosintética de las GAs (MacMillan, 1997). Particularmente, en el laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Celaya se han estado realizando investigaciones bioquímicas e ingenieriles con *G. fujikuroi* para optimizar la producción de GA<sub>3</sub>.

### **2.3. Propiedades Físicas, Químicas y Biológicas de las Giberelinas**

Las GAs químicamente son una familia de ácidos diterpenoides que presentan un sistema de anillos tetracíclicos (Bruckner and Blechschmidt, 1991a; Karakov y Aksöz, 2006). Durante los pasados 20 años, un total de 126 GAs, que difieren una de otra en el número y posición de sus grupos funcionales, han sido identificadas usando técnicas analíticas modernas (Tudzynski, 1999; Shukla y col., 2003; Karakov y Aksöz, 2006). En la Figura 1 se presenta el esqueleto estructural de las GAs. Se clasifican en dos grupos: Giberelinas C<sub>20</sub>, las cuales poseen completamente el esqueleto diterpenoide con 20 átomos de carbono; y Giberelinas

C<sub>19</sub>, las cuales perdieron biogenéticamente el átomo de carbono número veinte. Las Giberelinas C<sub>19</sub> presentan una alta actividad biológica y pertenecen a este grupo las giberelinas GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub> (Kumar y Lonsane, 1989).

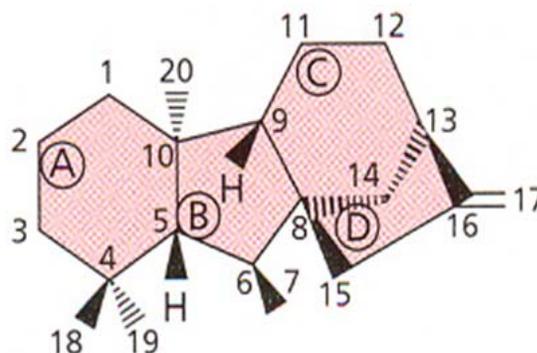


Figura 1. Estructura de las giberelinas.

Las GAs se caracterizan por una diversidad estructural, resultado de hidroxilaciones, oxidaciones, anillos acortados y la presencia de diferentes grupos funcionales. Entre las GAs, el GA<sub>3</sub>, es el más común por su alta concentración en fermentaciones microbianas y por su alta actividad biológica en plantas (Figura 2). También las GAs, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>, son biológicamente importantes debido a que son precursores inmediatos del GA<sub>3</sub>.

La fuente comercial de las GAs bioactivas, particularmente GA<sub>3</sub>, es por cultivo sumergido del hongo *Gibberella fujikuroi*, microorganismo en el que las GAs fueron identificadas originalmente como productos secundarios (Phinney, 1983). También la formación de GAs ha sido observada en otros hongos, tales como el *Sphaceloma manihoticola* (Rademacher y Graebe, 1979), *Neurospora crassa* (Kawanabe y col., 1983), *Phaeosphaeria sp.* (Sassa y col., 1994) y algunos otros patógenos de plantas (Rademacher, 1994). Es además, sintetizado en medio de cultivo por diversas bacterias tales como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas sp.* (Karakov y Aksöz, 2006). El fitopatógeno *G. fujikuroi* es único a causa de las relativamente altas cantidades de GAs que puede secretar (Linnemannstöns y col., 1999), es el único organismo capaz de excretar GAs en cantidades industriales (Oller-López y col., 2003).

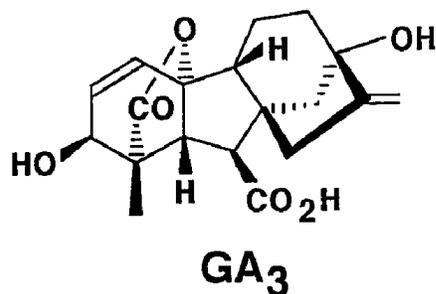


Figura 2. Estructura química del GA<sub>3</sub> (Shukla y col., 2003).

Químicamente, el GA<sub>3</sub>, es un ácido tetracíclico dihidroxi  $\gamma$ -lactónico con dos enlaces etileno y un grupo ácido carboxílico libre, tiene una fórmula empírica de C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>. Es un sólido cristalino de color blanco, soluble en agua hasta 5 g/L. Es soluble en solventes orgánicos tales como etanol, metanol, acetato de etilo, acetato de butilo y acetona. Es estable en fase sólida pero inestable en soluciones acuosas. En soluciones acuosas, el GA<sub>3</sub> presenta su mayor estabilidad en un rango de pH de 3 a 4 (Kuhr, 1962; Brückner y Blechschmidt, 1991a); y su descomposición es acelerada a altas temperaturas. La vida media en soluciones acuosas es de 14 días a 20 °C y 2 horas a 50 °C. El GA<sub>3</sub> puede sufrir procesos de degradación que juegan un papel importante tanto en la fermentación como en el proceso de recuperación. Alteraciones en el pH pueden llevar a transformaciones irreversibles a ácido iso-giberélico, ácido gibérico, ácido alogibérico y ácido giberelénico. Este último, es el producto estable de la hidrólisis química ácida del GA<sub>3</sub> (Holbrook y col., 1961; Berríos y col., 2004). Todos los compuestos producidos durante la degradación del GA<sub>3</sub> son moléculas biológicamente inactivas.

#### **2.4. Producción de ácido giberélico**

La producción de GA<sub>3</sub> es considerablemente influenciada por las condiciones de cultivo (físicoquímicas, nutricionales e hidrodinámicas) presentes en el biorreactor (Kumar y Lonsane, 1990; Hollman y col., 1995; Patiño, 1995; Solorza-Salas, 1999; Escamilla-Silva y col., 2000; Negrete-Rodríguez, 2002; Durán-Páramo y col., 2004; Monteiro-Machado y col., 2004; Almanza-Rangel,

2005; Shukla y col., 2005a; Chávez-Parga, 2005; Negrete-Rodríguez, 2007; Flores-Cano, 2008); Algunos de los factores importantes incluyen pH, temperatura, aireación, la composición del medio de cultivo y el tiempo de incubación. Mención aparte merece la cepa del microorganismo utilizado, debido a que el éxito o fracaso de un proceso fermentativo comienza con la selección de la cepa (Escamilla y col., 1999), la cual puede ser mejorada mediante mutación por diversos medios (por ejemplo luz UV) o utilizando herramientas de biología molecular.

El GA<sub>3</sub> se produjo por primera vez en 1938 por Yabuta y Sumiki, los cuales usaron un medio simple constituido por glucosa o glicerol como fuente de carbono y cloruro de amonio como fuente de nitrógeno; en un sistema estático obtuvieron 10 µg mL<sup>-1</sup> de GAs después de 30 a 45 días de cultivo.

En 1953 Kitamura obtuvo concentraciones de 37 µg mL<sup>-1</sup> de giberelinas bajo las mismas condiciones anteriores. La compañía inglesa “Imperial Chemical Industries” (ICI) obtuvo concentraciones de 200 µg mL<sup>-1</sup> en cultivos sumergidos en un medio de Raulin-Thom con 4% de sacarosa (Brückner y Blechschmidt, 1991a). Tanto la cepa como el proceso han sido mejorados en los últimos años, obteniéndose concentraciones superiores de GAs (Escamilla y col., 2000).

## **2.5. Aplicaciones comerciales**

Las GAs son metabolitos secundarios capaces de actuar como hormonas endógenas en organismos superiores. Sus aplicaciones incluyen la agricultura, horticultura, invernaderos, viticultura, e industria cervecera. Deben aplicarse en el momento adecuado y con una concentración apropiada, para obtener los siguientes beneficios:

Producción de frutos. Una de las principales utilidades del GA<sub>3</sub> es aumentar el tamaño de las uvas sin semilla (uvas Thompson Seedles, un cultivar de *Vitis vinifera*). Debido al reducido tamaño de los tallos de las uvas sin semilla, los racimos de uva están demasiado compactos y se reduce el crecimiento de los frutos. Las GAs estimulan la elongación del tallo, permitiendo a las uvas hacerse

más grandes al evitar la compactación, y al encontrarse menos apretadas son menos susceptibles a infecciones por hongos. Usualmente, las plantas se rocían dos veces, una en la floración y otra cuando se forman los frutos. También se han rociado GAs sobre hojas y frutos de árboles de naranja California (*Citrus aurantium*), cuando los frutos han perdido casi todo su color verde, para impedir varios trastornos de la cáscara que aparecen durante su almacenamiento. En este caso las hormonas retrasan la senescencia y mantienen más firmes las cáscaras del fruto.

Aumento en la producción de la caña de azúcar. La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una de las pocas plantas que almacena sus carbohidratos en forma de azúcar (sacarosa), en lugar de almidón. Originaria de Nueva Guinea, la caña de azúcar es una herbácea perenne que puede alcanzar una altura entre 4 y 6 m. La sacarosa es almacenada en las vacuolas de las células del parénquima de los entrenudos. El tratamiento con GA<sub>3</sub> puede aumentar el rendimiento de la caña hasta 20 toneladas por hectárea y la producción de azúcar alrededor de 2 toneladas por hectárea. Este incremento es el resultado de la estimulación de la elongación de los entrenudos durante el invierno.

En la horticultura se utiliza para cultivos de alcachofas, apio, espinaca, lechuga. En el cuadro 1 se muestran algunos de los usos y aplicaciones del ácido giberélico en la agricultura y horticultura.

Elaboración de malta de cebada. Este proceso es la primera etapa en el proceso de la elaboración de cerveza. Durante la elaboración de la malta, se produce la germinación de las semillas de cebada (*Hordeum vulgare*) a temperaturas que maximizan la producción de enzimas hidrolíticas por la capa de aleurona. Algunas veces se utiliza el GA<sub>3</sub> para aumentar la velocidad del proceso de elaboración de malta.

Cuadro 1. Algunos usos del GA<sub>3</sub> en la agricultura y horticultura.

<b>Cultivo</b>	<b>Efectos</b>	<b>Aplicación</b>
<b>Caña</b>	Incrementa el rendimiento de la cosecha a más de 12.5 Ton por hectárea y la producción de azúcar de 0.5 a 1.5 Ton por hectárea.	150g de GA <sub>3</sub> por hectárea; aplicación como caldo, semipurificado y cristales.
<b>Papa</b>	Rompe la inactividad (particularmente útil en climas con 2 o 3 cosechas en la temporada).	Tratamiento de baño.
<b>Alcachofa</b>	Incrementa el número de botones por planta; adelanta la cosecha por varias semanas.	120 ppm mediante aplicación foliar.
<b>Ruibarbo</b>	Rompe la inactividad en las primeras cosechas.	Aplicación de solución de GA <sub>3</sub> a la copa de la planta.
<b>Lúpulo</b>	Incrementa rendimientos hasta del 40%.	5 a 15 ppm mediante aplicación spray.
<b>Jitomate</b>	Incrementa rendimientos.	40 g por hectárea mediante aplicación spray (2 a 3 veces).

El costo de GA<sub>3</sub> ha restringido su aplicación en el crecimiento y desarrollo de plantas, excepto para ciertas plantas de alto valor (Shukla y col., 2005b; Karakov y Aksöz, 2006). Existen algunas causas por las cuales el uso del GA<sub>3</sub> es pobremente aplicado.

- Tiene un alto valor en el mercado internacional, alrededor de 40 USD/g.
- El GA<sub>3</sub> requiere de periodos más grandes de tiempo para hacer notar sus efectos en comparación con los fertilizantes.
- El tiempo ideal y las concentraciones óptimas aun no son bien conocidas por lo que puede provocar efectos no deseados (inhibición de la floración en árboles frutales por algunos años después de que se aplicó el tratamiento).

## 2.6. Metabolismo secundario microbiano

La producción fermentativa de GAs es un clásico ejemplo de una fermentación metabólica secundaria. Los metabolitos secundarios presentan diversas características destacando las siguientes (Vining, 1992):

- No son esenciales para el crecimiento pero podrían tener valor de supervivencia para los organismos productores (actúan como un mecanismo de defensa).
- Son moléculas sintetizadas por ciertos microorganismos.
- Tienen un amplio intervalo de estructuras químicas y actividades biológicas.
- Los compuestos tienen estructuras sofisticadas, mecanismos de acción y vías energéticamente costosas y complejas.
- Se derivan de rutas biosintéticas únicas de intermediarios y metabolitos primarios; estas vías son frecuentemente largas y complejas.
- La producción puede perderse fácilmente por mutación espontánea, por lo que son muy importantes las técnicas de conservación de estos microorganismos.

Una característica del metabolismo secundario es que los metabolitos o idiolitos no son usualmente producidos durante la fase de crecimiento rápido (trofofase), pero se forman durante una etapa de producción subsecuente conocida como idiofase (Drew y Demain, 1977; Wang y col., 1979), como se muestra en la Figura 3. En *G. fujikuroi* el crecimiento exponencial cesa cuando la fuente de nitrógeno asimilable se agota en el medio de cultivo, entonces sobreviene la idiofase, la cual se caracteriza por iniciar la formación de GAs y compuestos de almacenaje (Brückner y Blechschmidt, 1991b).

La formación de los metabolitos secundarios es regulada por factores ambientales. Existen evidencias de que el metabolismo secundario tiene una prioridad menor que el crecimiento (Cane, 1994). Cuando los microorganismos se cultivan en un medio rico, balanceado de nutrientes, estos no producen metabolitos secundarios o si lo hacen es a un nivel bajo. La formación del

metabolito usualmente empieza cuando algún nutriente se agota en el medio de cultivo. La biosíntesis de GAs en *G. fujikuroi* comienza después del agotamiento de la fuente de nitrógeno (Rybakov y Bourd, 1991; Sánchez-Fernández y col., 1997; Giordano y col., 1999).

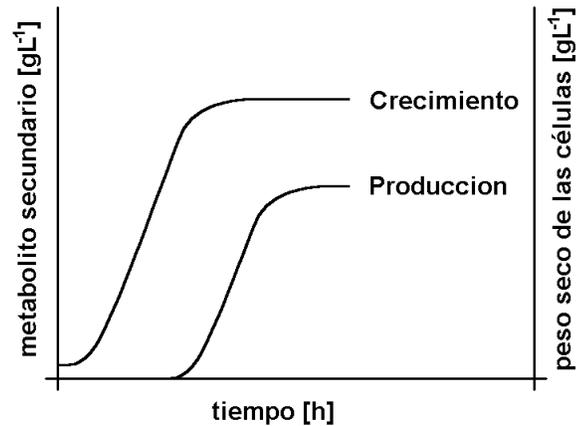


Figura 3. Formación de metabolitos secundarios durante la idiofase (Wang y col., 1979).

El metabolismo secundario ocurre efectivamente cuando la tasa de crecimiento se reprime, después de que el crecimiento ha sido frenado. La distinción entre las fases de crecimiento y de producción del metabolito secundario, algunas veces es muy clara, pero en muchas ocasiones la idiofase se sobrepone a la trofofase. La mayoría de los metabolitos secundarios o idiolitos son formados a través de rutas biosintéticas con múltiples etapas de reacción mediadas por enzimas. Los genes que codifican estas enzimas son comúnmente cromosomales. Esto es, la expresión de los genes es controlada por factores nutricionales (carbono, nitrógeno, fósforo), inductores y tasas del crecimiento (Demain, 1991).

Los metabolitos secundarios se construyen a partir de una serie de enzimas, trabajando con moléculas precursoras derivadas del metabolismo primario; aunque existe solamente una molécula pequeña como producto final de la síntesis, está depende de muchos genes, quienes controlan diferentes rutas

enzimáticas. Las enzimas que catalizan los pasos de la ruta biosintética secundaria son difíciles de aislar (Bennett, 1995).

Existen cinco mecanismos de regulación para que ocurra el metabolismo secundario. Todos ellos, tienen su efecto en alguna región del genoma, expresando los genes correspondientes del metabolismo secundario. Los mecanismos son:

1. Regulación por producto final. Es un mecanismo regulatorio común en la biosíntesis de metabolitos primarios. Altas concentraciones del último metabolito en la ruta normalmente inhibe el primer paso de la ruta biosintética. Los microorganismos productores de antibióticos se encuentran aparentemente protegidos contra la sobreproducción mediante este mecanismo, de esta manera, las enzimas claves involucradas en su biosíntesis son inhibidas (Demain, 1974).

2. Regulación por la fuente de carbono o energía. Borrow y col., (1964) reportaron que altas cantidades de glucosa inhiben la producción de GAs. La síntesis de enzima, inhibición de la actividad enzimática, son afectadas por la presencia de sustratos usados rápidamente para el crecimiento (Drew y Demain, 1977). La represión catabólica por carbono se ha eliminado empleando medios de cultivo complejos ó realizando las fermentaciones por lote alimentado (Shukla y col., 2003). Vass y Jefferys (1979), sugieren incorporar aceite de plantas en las fermentaciones de GAs, ya que podrían contener precursores naturales. La intensidad del metabolismo secundario se puede incrementar por la adición de precursores limitantes (fuentes complejas de sustratos o de lenta asimilación).

3. Regulación por la fuente de nitrógeno. El hecho de que la biosíntesis de metabolitos secundarios sea reprimida por un exceso de los iones amonio o por algunos aminoácidos ha sido aceptada ampliamente. Durante la producción de antibióticos se emplean fuentes complejas de nitrógeno, debido principalmente, a su lenta velocidad de asimilación y por tanto, las sales de amonio y los aminoácidos represivos no se acumulan. La biosíntesis de las GAs como metabolitos secundarios establecen su producción en *G. fujikuroi* por la regulación de la fuente de nitrógeno (Brückner y Blechschmidt, 1991b; Rybakov y Bourd,

1991). Al igual que con carbono, la represión catabólica por nitrógeno en el hongo *G. fujikuroi*, se ha eliminado empleando medios de cultivo complejos ó realizando las fermentaciones por lote alimentado (Shukla y col., 2003).

4. Regulación por la fuente de fósforo. Los iones fosfato son esenciales para todas las reacciones que requieren energía, tales como la síntesis de ADN, ARN, proteínas, en el metabolismo del carbono y de nitrógeno, y en algunos procesos celulares como la multiplicación celular. Se ha encontrado que el nivel de trifosfato de adenosina en la célula decrece marcadamente antes de la producción de metabolitos secundarios. El efecto de los iones fosfato en la biosíntesis de metabolitos secundarios está involucrada en la inhibición de la síntesis de fosfatasas, donde el fosfato u otro compuesto relacionado reprimen o inhiben a las sintetetasas o fosfatasas (Rehm y Reed, 1981). En *G. fujikuroi* las GAs se biosintetizan bajo el control específico del nitrógeno, más no del fosfato o de la tasa de crecimiento (Giordano y col., 1999).

5. Efecto de compuestos autoreguladores. Estos compuestos son de bajo peso molecular y se encuentran en el microorganismo productor a bajas concentraciones (Horinouchi y Beppu, 1992). En *G. fujikuroi* se desconoce cual es el compuesto regulador en la biosíntesis de las GAs.

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

Los primeros pasos de la vía biosintética de las GAs a partir de difosfato de geranilgeranilo (GGDP) hasta el aldehído-GA<sub>12</sub> (Figura 4) son idénticos en plantas y hongos, pero la vía diverge después de ahí. Por ello, se ha sugerido que la presencia de esta vía en *G. fujikuroi* puede ser un ejemplo de transferencia horizontal de genes de la planta huésped al patógeno (Tudzynski y Höltner, 1998).

El principal producto final de la vía en *G. fujikuroi* es GA<sub>3</sub>, el cual es comúnmente detectado y activo en plantas superiores, aún siendo un componente menor en la mayoría de especies de plantas (Rojas y col., 2001). Los tejidos de las plantas usualmente contienen 0.001 a 1.0 mg de GA<sub>3</sub> por kg de peso fresco (Brückner y Blechschmidt, 1991a). Las GAs son diterpenoides, y están

relacionadas con otros compuestos isoprenoides, tales como carotenoides, esteroides y ubiquinonas debido a su biosíntesis a partir de hidroximetilglutaril (HMG) coenzima A vía la formación secuencial de ácido mevalónico, difosfato de isopentenilo, difosfato de geranilo, difosfato de farnesilo (FDP) y GGDP. Después de la formación de GGDP, la ruta de las GAs y los carotenoides se separa (Ver figura 4). La ciclización de dos pasos de GGDP a *ent*-kaureno, vía el intermediario difosfato de *ent*-copalilo (CPP), es el primer paso específico en la ruta de las GAs y se piensa que es el paso limitante tanto en plantas como en hongos (Hedden y Kamiya, 1997; Sun y Kamiya, 1997). El *ent*-kaureno altamente hidrofóbico se oxida entonces por uno o más de los citocromo P450-monooxigenasas a ácido *ent*-kaurenoico vía *ent*-kaurenol y *ent*-kaurenal. En *G. fujikuroi* se observó que la formación de ácido 7 $\alpha$ -hidroxi-kaurenoico es catalizado también mediante una citocromo P450-monooxigenasa (Jennings y col., 1993). El siguiente paso, una oxidación final en C-6 $\beta$ , del ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxi-kaurenoico resulta en la contracción del anillo B, lo que conduce a la formación de aldehído-GA<sub>12</sub>, el primer *ent*-giberelano dentro de la ruta, ésta reacción es catalizada mediante la aldehído-GA<sub>12</sub> sintasa (MacMillan, 1997).

En *Gibberella fujikuroi*, el aldehído-GA<sub>12</sub> representa un punto de ramificación para dos rutas paralelas produciendo las GAs 3 $\beta$ -nohidroxiladas y las 3 $\beta$ -hidroxiladas (Figura 5). La principal vía comienza por la 3 $\beta$ -hidroxilación hasta aldehído-GA<sub>14</sub> y conduce a la producción de GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> y GA<sub>3</sub>. La oxidación en la posición C-7 conduce de aldehído-GA<sub>12</sub> al ácido carboxílico GA<sub>12</sub> y de aldehído-GA<sub>14</sub> a GA<sub>14</sub> (Tudzynski, 2005).

En ambas ramificaciones de la ruta las C<sub>20</sub>-GAs, tienen que ser transformadas a C<sub>19</sub>-GAs, moléculas biológicamente activas, por oxidación sucesiva del C-20 de un grupo metilo en GA<sub>12</sub> o GA<sub>14</sub> a través de alcohol y aldehído. El átomo de carbono del grupo aldehído se elimina como CO<sub>2</sub> produciendo la lactona C<sub>19</sub>. La GA<sub>4</sub> es la primera GA activa biológicamente, la cual es desaturada para convertirse en GA<sub>7</sub>, quien a su vez se convierte en GA<sub>3</sub> por hidroxilación en el C-13 (Ver Figura 5).

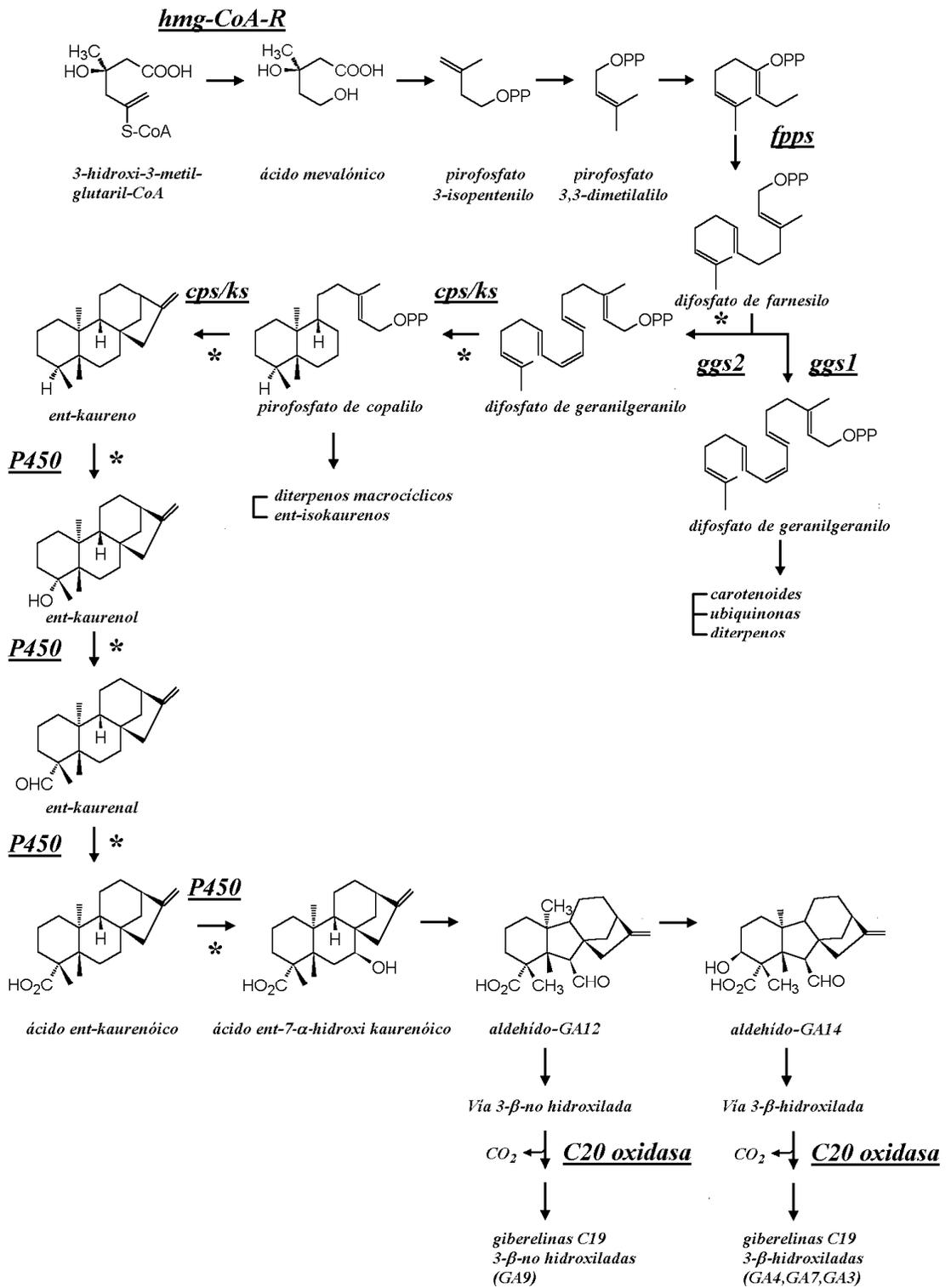


Figura 4. Ruta biosintética de las giberelinas en *Gibberella fujikuroi* (Tudzynski y Hölter, 1998).

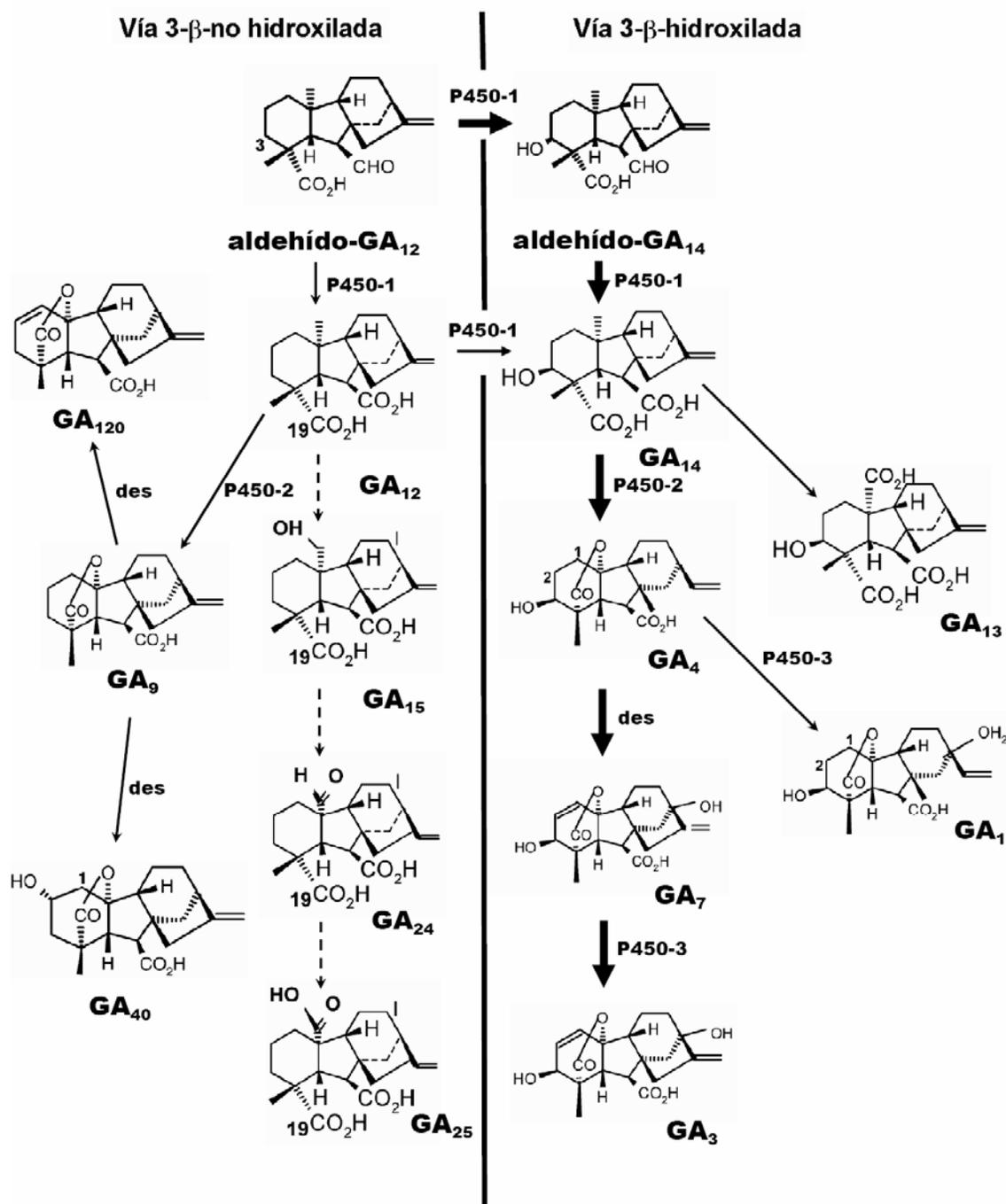


Figura 5. Rutas biosintéticas 3β-nohidroxilada y 3β-hidroxilada para la síntesis de giberelinas (Tudzynski, 2005).

## **2.8. Formas de obtención de las giberelinas**

Hasta la fecha, la obtención de GAs se consigue de tres formas: Síntesis química, extracción de plantas y fermentación microbiana.

### **2.8.1. Síntesis química**

La síntesis química es un proceso muy costoso, no es muy utilizada porque requiere muchas etapas que involucran reactivos muy caros (Kumar y Lonsane, 1989). Las GAs obtenidas por esta vía se destinan principalmente a la investigación.

### **2.8.2. Extracción de plantas**

Existe una pequeña cantidad de giberelinas en las plantas y es por ello que no es muy viable su obtención. En 1956, West y Phinney fueron los primeros en demostrar la presencia de giberelinas en plantas superiores. Después, en trabajos posteriores se encontró la presencia de las giberelinas en más variedades de plantas. La cantidad de giberelinas que contienen las partes vegetativas de la planta es muy baja (microgramos por kilogramo de planta fresca) en comparación con los 10-100 mg/kg de planta fresca que contienen en sus partes reproductoras como las semillas y tallos. La extracción de GAs de los tejidos de las plantas es por una maceración suave utilizando metanol, y la subsiguiente partición de GAs libres con acetato de etilo a un pH de 2.5. Este proceso de extracción no es factible económicamente debido a las concentraciones demasiado bajas de GAs en plantas (Kumar y Lonsane, 1989).

### **2.8.3. Fermentación Microbiana**

La fermentación es la forma tradicional y económicamente factible de obtener GAs para uso industrial, a partir de cepas seleccionadas de *G. fujikuroi*, que producen principalmente GA<sub>3</sub> (Candau y col., 1991; Brückner y Blechschmidt, 1991b; Rybakov y Bourd, 1991; Uscanga-Reynell, 1992; Sunder y Satyavir, 1998; Escamilla-Silva y col., 1999; Giordano y col., 1999; Raventos y col., 2000). La fermentación por lotes, en biorreactores con agitación mecánica es un proceso

común para la obtención de GAs. Los primeros ensayos de producción de estos compuestos se efectuaron por investigadores japoneses en cultivos estacionarios, obteniéndose bajos rendimientos (40-60 mg L<sup>-1</sup>) en periodos largos de incubación (7-10 días) (Jefferys, 1970). Sin embargo, en experimentos realizados en matraces agitados con el mismo medio, se obtuvo una concentración de GA<sub>3</sub> de 200 mg L<sup>-1</sup>. Alrededor de 1954, la compañía “Imperial Chemical Industries” (ICI) inició la producción de giberelinas de manera comercial a escala de laboratorio utilizando *Gibberella fujikuroi*. Para este propósito se usaron técnicas por cultivo en lote. A partir de los años 70's las fermentaciones se llevaron a cabo en procesos de cultivo por lote alimentado. Actualmente países como Estados Unidos, Inglaterra, Japón, Hungría, Polonia y China producen GAs por métodos fermentativos, siendo el cultivo sumergido la técnica más utilizada.

Para alcanzar una máxima producción de giberelinas, es importante considerar: 1) el microorganismo a utilizar (diferentes cepas del hongo *G. fujikuroi*), 2) la composición del medio de cultivo y 3) las condiciones fisicoquímicas para el proceso (Brückner y col., 1991).

## **2.9. Proceso de fermentación**

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 se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas (Ertola y col., 1995).

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

Fuente de C + Fuente de N + O<sub>2</sub> + fosfatos + minerales → Biomasa + productos + CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O + Calor

Durante una fermentación son necesarios los siguientes requisitos: tener un microorganismo de características idóneas para el proceso y/o producto particular,

proporcionar un medio de cultivo adecuado, el cual debe contener los nutrientes esenciales en las proporciones apropiadas; establecer y controlar las condiciones fisicoquímicas necesarias en el desarrollo de la fermentación y finalmente controlar los factores que favorecen la inhibición del crecimiento.

### **2.9.1. Cultivo sumergido**

Los metabolitos secundarios son principalmente producidos bajo condiciones sumergidas, esta técnica ofrece muchas ventajas tales como fácil operación, ocupa poco espacio, confiabilidad en la inoculación y los patrones de crecimiento, un mayor control aséptico para evitar contaminación y permite el control de parámetros, tales como pH, temperatura, condiciones nutricionales, entre otros (Robinson y col., 2001). Este proceso puede llevarse a cabo en distintos tipos de fermentadores, como el de tanque agitado, equipados para el control de parámetros. La fermentación en cultivo sumergido, es una técnica familiar donde el escalamiento de nivel laboratorio a un fermentador industrial es mucho más simplificado y los parámetros pueden ser fácilmente monitoreados y controlados.

### **2.9.2. Microorganismo productor**

Debido a que el éxito o fracaso de un proceso fermentativo comienza con el microorganismo empleado, en la elección del mismo se deberían tener en cuenta ciertos criterios generales que se indican a continuación (Ertola y col., 1995):

- La cepa a utilizar debe ser genéticamente estable.
- Su velocidad de crecimiento debería 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 fermentativo completo en un tiempo corto.
- Si el objetivo del proceso es un producto, este debe ser de alto rendimiento y de fácil extracción del medio de cultivo.

Diversas cepas del hongo *G. fujikuroi* son utilizadas para la producción de GA<sub>3</sub> y otras GAs.

### **2.9.3. Biorreactor**

El biorreactor, es sin duda, uno de los equipos fundamentales de la microbiología industrial. Es el recipiente donde se realiza el proceso de fermentación, y su diseño debe ser tal que asegure un ambiente uniforme y adecuado para los microorganismos. Debe cumplir con dos requisitos fundamentales: mantener un medio homogéneo sin zonas “muertas” y a la vez transferir oxígeno al medio empleando el mínimo de energía posible (Lee, 1992). Las "tareas" que realiza el biorreactor pueden resumirse del siguiente modo:

- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación.
- Mantener constante y homogénea la temperatura.
- Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes.
- Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo.
- El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente sembrado 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 que inyecte aire en el cultivo.

En el biorreactor de tanque agitado la agitación se realiza mecánicamente mediante un eje provisto de turbinas accionado por un motor. El aire se inyecta al tanque y es distribuido por pequeños orificios espaciados regularmente. El chorro

de aire que sale de cada orificio es "golpeado" por las paletas de la turbina inferior generándose de este modo miles de pequeñas burbujas de aire, desde las cuales difunde el  $O_2$  hacia el seno del líquido. El sistema de agitación se completa con cuatro o seis deflectores que tienen por finalidad cortar o romper el movimiento circular que imprimen las turbinas al líquido, generando de este modo mayor turbulencia y mejor mezclado. El tanque está rodeado por una chaqueta por la que circula agua, lo que permite controlar la temperatura. El aire que ingresa al biorreactor debe estar estéril, lo que se consigue haciéndolo pasar por un filtro cuyo diámetro de poro es de 0.45 micrones, que impide el paso de microorganismos y esporas.

Los biorreactores existentes se clasifican de la siguiente manera: tanque agitado, columna de burbujas y air-lift. En el Cuadro 2, se muestran las ventajas y desventajas que presentan cada uno de los tipos de reactores anteriormente mencionados.

#### **2.9.4. Condiciones de cultivo**

La producción de  $GA_3$  esta considerablemente influenciada por las condiciones de cultivo. Para obtener altas producciones de  $GA_3$  deben seleccionarse cuidadosamente el medio de cultivo, la temperatura, pH, tiempo de incubación, aireación/agitación, entre otras variables de operación.

#### **2.9.5. Componentes del medio de cultivo (nutrientes)**

Los componentes del medio de cultivo desempeñan un papel esencial en el crecimiento del microorganismo y formación de producto(s). Deben satisfacer los requerimientos de nutrientes para la síntesis de componentes celulares, además de suministrar energía para la síntesis de metabolitos y para el mantenimiento celular. No obstante que los microorganismos varían considerablemente respecto de los nutrientes que pueden necesitar, es posible efectuar la distinción de las siguientes categorías:

Cuadro 2. Ventajas y desventajas de algunos tipos de biorreactores.

<b>Biorreactor</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Tanque agitado</b>	Flexible y adaptable.	Gran consumo de potencia.
	Amplio rango de velocidad de agitación.	Daño a células debido a los esfuerzos de corte.
	Capacidad para manejar medios de alta viscosidad.	Alto costo de equipamiento.
<b>Columna de burbujeo</b>	No presenta partes en movimiento.	Baja eficiencia de mezclado.
	Bajo costo de equipamiento.	No recomendable para sistemas con alta viscosidad.
	Gran concentración celular.	Excesiva generación de espuma.
<b>Air-lift</b>	No presenta partes en movimiento.	Baja eficiencia de mezclado, cuando se usan caldos de cultivo de alta viscosidad.
	Alta eficiencia en la absorción de gas.	No recomendable para sistemas con alta viscosidad.
	Excelente transferencia de calor.	Excesiva generación de espuma.

Fuente: Lee, 1992.

### **2.9.5.1. Macronutrientes**

Se requieren en grandes cantidades, están representados por las fuentes de C (glucosa, glicerol, sacarosa y aceites naturales), N (Sulfato de amonio, cloruro de amonio, glicina, tartrato de amonio, peptonas, extracto de levadura), P, S, K y Mg.

#### **2.9.5.1.1. Fuente de carbono y nitrógeno**

Las fuentes de carbono cumplen también el papel de ser fuente de energía. A pesar que la glucosa es la fuente de carbono más usada en la biosíntesis de GAs, existen reportes que al inicio de un cultivo microbiano deben evitarse

concentraciones por encima del 20 %, debido a que causa represión catabólica (Monteiro-Machado y Soccol, 2007). Una alternativa para evitar la represión catabólica es el uso de fuentes complejas; entre las que están los almidones, el licor de maíz, la maltosa, galactosa, harinas y aceites vegetales. El empleo de las fuentes complejas de origen vegetal, como las harinas, aceites vegetales y el licor de maíz, han reportado incrementos en la producción con respecto a fuentes inorgánicas; lo que se atribuye a la presencia de precursores de la biosíntesis de GAs (Vass y Jefferys, 1979). Al empleo de harinas, se atribuye también que proporcionan compuestos nitrogenados, los cuales pueden afectar la capacidad amortiguadora del medio de cultivo; lo que hace imposible precisar el efecto de algún componente en particular de las harinas vegetales. Gancheva y col. (1984) y Muromtsev y Agnistova (1984), reportaron resultados satisfactorios en la producción de GAs utilizando aceites naturales. El aumento en el rendimiento de GAs se atribuye a que los aceites vegetales favorecen la disponibilidad de acetyl-CoA para su producción (Kumar y Lonsane, 1989; Tudzynski, 1999); además, esta reportado que podrían contribuir al incremento de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (Tudzynski, 1999; Shukla y col., 2003).

La fuente de nitrógeno puede ser de naturaleza orgánica o inorgánica y es utilizado para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. La selección de la fuente de nitrógeno, su concentración y su relación inicial con la fuente de carbono son determinantes en la biosíntesis de GAs y en la productividad de GA<sub>3</sub> (Monteiro-Machado y Soccol, 2007). El empleo de una baja concentración de nitrógeno proveniente de fuentes simples como sulfato y cloruro de amonio, o de fuentes complejas como el licor de maíz y las harinas vegetales (cacahuate, arroz, maíz, algodón y soya) tienen efecto positivo en la biosíntesis de GAs. Como ya se mencionó la cepa empleada es muy importante, con la cepa *F. moniliforme 61* se encontró que concentraciones de 0.28 g N L<sup>-1</sup> (tomado de NaNO<sub>3</sub> ó NH<sub>4</sub>Cl) reportan la más alta productividad, mientras que concentraciones superiores de nitrógeno, tomado de NH<sub>4</sub>Cl, disminuye la productividad en relación a emplear NaNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno. Al respecto, Sánchez-Fernández y col., (1997) estudiaron el efecto del nitrato y del amonio en la cepa IMI58289 y

mutantes que carecen de la capacidad para reducir el nitrato, pero no encontraron efecto en la producción de GAs cuando ensayaron con  $0.168 \text{ g N L}^{-1}$  de cada fuente. La cepa IMI58289 convierte el nitrato en amonio, así que una inhibición en la biosíntesis de GAs por nitrato puede ser fuertemente distinguida de la inhibición por amonio. El nitrógeno inorgánico inhibe la actividad de la enzima GA<sub>4</sub> 1,2-deshidrogenasa involucrada en la biosíntesis de GAs, por lo que se ha sugerido que no debe existir nitrógeno en la etapa de producción (Giordano y col., 1999).

#### **2.9.5.1.2. Otros macronutrientes**

Los requerimientos de P, S, K y Mg son suministrados en forma de sales. El P se incorpora en 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, entre otros. Una parte importante del K está unida al RNA de manera que los requerimientos de K aumentan con los factores que influyen en el aumento del RNA en las células, como la velocidad de crecimiento. El ión K actúa como coenzima y probablemente actúa como catión en la estructura aniónica de varios componentes celulares. El ión Mg es esencial para la estabilidad de los ribosomas y actúa como cofactor en numerosas reacciones del metabolismo (Ertola y col., 1995).

#### **2.9.5.2. Micronutrientes**

Estos elementos trazas están representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn, Co y Cu, que se agregan a los medios en cantidades de mg o  $\mu\text{g L}^{-1}$ , y son frecuentemente esenciales para el crecimiento; y dentro de los que son raramente esenciales se encuentran Al, B, Na, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Sn e I (Ertola y col., 1995). A veces es difícil demostrar un requerimiento de un micronutriente porque generalmente esta presente en suficiente cantidad como impureza de los componentes principales.

Es importante contar con un medio de cultivo adecuado ya que es una mezcla que contiene las concentraciones y cantidades necesarias de los

nutrientes requeridos para un buen crecimiento del microorganismo y desde luego para la producción del metabolito deseado.

### **2.9.6. Temperatura**

El efecto de la temperatura sobre la producción de GA<sub>3</sub>, es dependiente de la cepa empleada (Monteiro-Machado y Soccol, 2007). La temperatura óptima para la producción de GA<sub>3</sub> de la cepa *Gibberella fujikuroi* CDBB H-984 se ha reportado de 29 °C ( Escamilla y col., 2000).

### **2.9.7. pH**

La velocidad específica de crecimiento y producción de GAs se han reportado constantes en el intervalo de 3.5 a 6.5 (Brückner y Blechschmidt, 1991a). Para la producción específica de GA<sub>3</sub> se ha estudiado la fermentación en el intervalo de pH de 2 a 6, aunque con pH superior a 5.5 se producen otras giberelinas como GA<sub>4</sub>/GA<sub>7</sub> (Negrete-Rodríguez, 2007).

### **2.9.8. Aireación**

Dado que la biosíntesis de GAs involucra muchos pasos oxidativos, una buena aireación del biorreactor es crítica para una producción óptima. En los microorganismos aerobios estrictos, la obtención de energía esta ligada a la presencia de O<sub>2</sub>. En efecto, este es el aceptor final de los electrones provenientes de la cadena de citocromos donde se genera abundante ATP (trifosfato de adenosina). Las moléculas de ATP aportarán la energía necesaria para las reacciones de síntesis con las que el organismo se “fabricará” a sí mismo, y la requerida para el mantenimiento celular. En la práctica, se utiliza el concepto de concentración crítica de O<sub>2</sub> disuelto, entendiéndose por tal, el valor por encima del cual la velocidad específica de consumo de O<sub>2</sub>, es independiente de la concentración de O<sub>2</sub> disuelto y por tanto, el crecimiento no esta limitado por O<sub>2</sub>.

Los valores de concentración crítica para la mayoría de los microorganismos están en el orden de 0.1 a 1 mg L<sup>-1</sup>, valores relativamente bajos

si se compara con el de la solubilidad del  $O_2$ , que a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  y  $0.21$  atmósferas en medios acuosos diluidos es de  $7.8\text{ mg L}^{-1}$ . Esto podría conducir al error de suponer que no constituye un problema satisfacer los requerimientos de  $O_2$  en los cultivos (Ertola y col., 1995). El oxígeno disuelto en el medio de cultivo es muy poco soluble y el consumo de oxígeno para el crecimiento microbiano es alto. Cuando el suministro de oxígeno es a través de una corriente de aire, la concentración de  $O_2$  máxima en el líquido es de  $6$  a  $8\text{ mg L}^{-1}$  (Lee, 1992). El suministro de aire es muy importante para la producción de GAs con altos rendimientos, ya que es una fermentación estrictamente aeróbica (Brückner y Blechschmidt, 1991a). En los procesos de fermentación aerobia es necesario un suministro adecuado de oxígeno que satisfaga los requerimientos metabólicos de los microorganismos empleados. La oxidación de la fuente de carbono su transformación en células, productos y  $CO_2$  establece una demanda de oxígeno que es esencial satisfacer a través de la aireación y mezclado (Kumar y Lonsane, 1989).

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

### **2.9.9. Mezclado**

El mezclado no solo ayuda a mantener una homogeneidad en el medio de cultivo si no que también favorece a la dispersión de burbujas de aire mejorando así la transferencia de masa y calor. La aireación y mezclado ayudan a remover el dióxido de carbono y otros metabolitos gaseosos que inhiben la producción de las GAs.

### **2.10. Crecimiento microbiano**

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos, comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le

aporta el medio de cultivo para “fabricar” nuevos microorganismos. Este proceso continua hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota (sustrato limitante) y el crecimiento se detiene.

Cuando *G. fujikuroi* se crece en diferentes medios de cultivo limitados por nitrógeno, se han descrito hasta cinco fases de la fermentación (Kumar y Lonsane, 1989). En la Figura 6 se representa la curva característica de crecimiento de un microorganismo (Ertola y col., 1995), cultivado por lotes, donde se pueden apreciar distintas fases durante el crecimiento.

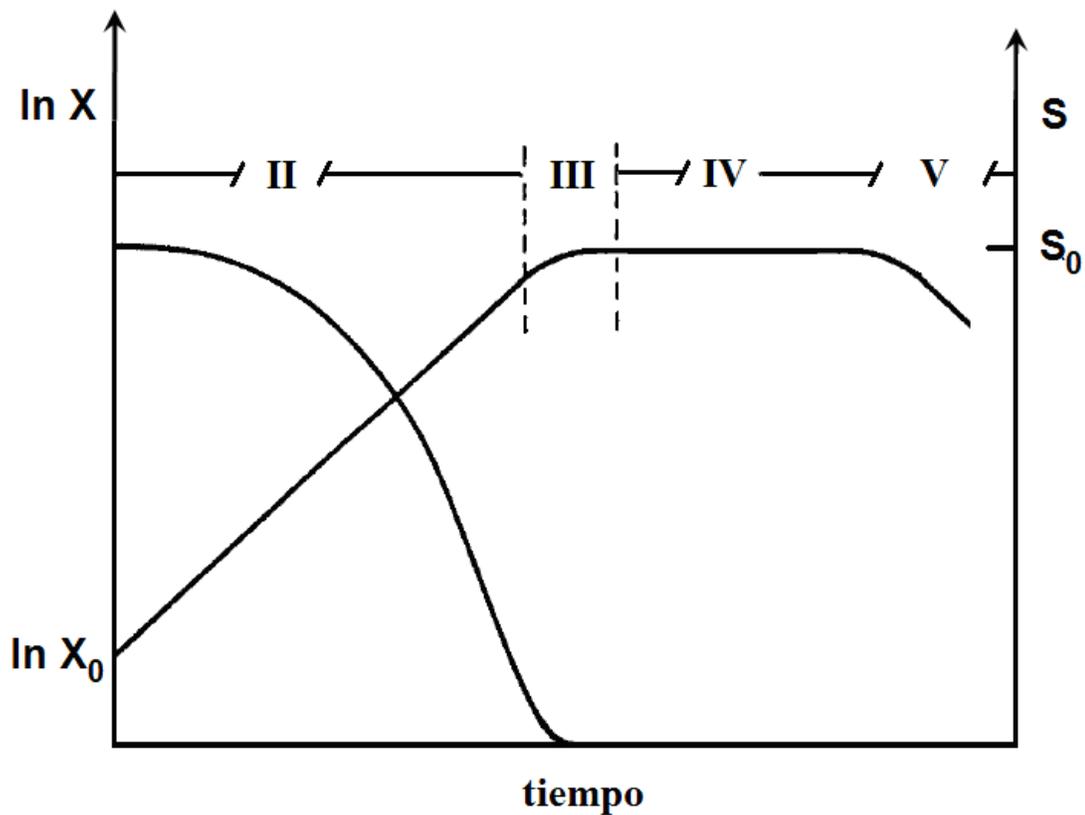


Figura 6. Curva característica de crecimiento y consumo de sustrato en un cultivo por lote.

La fase exponencial (II) es también conocida como crecimiento exponencial porque la velocidad de crecimiento de las células es proporcional a la concentración de las células. En esta fase las células se dividen con rapidez máxima porque todas las rutas enzimáticas para metabolizar el medio están operando (como resultado de la fase lag) y las células pueden aprovechar los

nutrimentos con eficiencia óptima (Lee, 1992). Cuando se utiliza un sistema de cultivo por lotes, es posible calcular el valor de  $\mu_m$  (velocidad de crecimiento específica máxima) graficando el logaritmo natural de la biomasa ( $\ln X$ ) en la fase exponencial en función del tiempo:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_m t$$

donde:

X = Biomasa

$X_0$  = Biomasa inicial

t = Tiempo

Antes de la fase exponencial, suele existir otra fase conocida como fase de adaptación (fase lag), durante la cual, la concentración de biomasa no se modifica substancialmente. Es una fase en la que las células se adaptan a su nuevo entorno, sintetizando enzimas y preparándose para empezar a reproducirse. Ocurren profundos cambios en la composición macromolecular y en el “estado fisiológico” de las células; es durante este periodo que las células realizan funciones como sintetizar proteínas de transporte para acarrear el sustrato al interior de la célula, sintetizar enzimas para aprovechar el nuevo sustrato, e iniciar la tarea de copiar el material genético de la célula. Normalmente esta fase no es deseable ya que significa una pérdida de tiempo por lo que usualmente se trata de minimizarla.

La fase de desaceleración (III), es importante porque el crecimiento esta “equilibrado” y la rapidez de crecimiento varían en función de la concentración de sustrato residual en cultivos limitados por el sustrato.

La fase IV es la correspondiente a la fase estacionaria, donde la tasa de crecimiento es cero como resultado del agotamiento de los nutrientes. Muchos productos de fermentación se generan en esta fase.

Después de la fase estacionaria, sobreviene la fase de declinación (V) que consiste en una disminución de la concentración de biomasa debida a la lisis celular. Este fenómeno ocurre porque durante la fase estacionaria la rapidez de desaparición (muerte) puede volverse más alta que la rapidez de crecimiento, en cuyo caso disminuye la densidad de células. Esta baja es resultado de los subproductos tóxicos y/o agotamiento del abasto de nutrientes.

Por otro lado, Borrow y col. (1964), definen fases productivas y no productivas durante el proceso de fermentación de GAs en *G. fujikuroi* en medios de cultivo limitados por nitrógeno. Durante la fase de balance el crecimiento es exponencial y el consumo de nutrientes es directamente proporcional a la acumulación de peso seco. En la siguiente fase de almacenamiento, cuando el nitrógeno se agota, el peso seco continúa incrementándose debido a la acumulación de lípidos, carbohidratos y polioles. En esta fase, empieza la producción de GAs y otros metabolitos secundarios como bikaverinas y carotenoides. La siguiente fase de mantenimiento es la principal fase productora de GAs; el GA<sub>3</sub> alcanza su valor máximo.

### **2.11. Acetil-CoA: nodo metabólico común en la biosíntesis de lípidos y giberelinas**

El acetil-CoA es un intermediario central del metabolismo oxidativo en las mitocondrias, que se deriva de la descarboxilación del piruvato obtenido por la bioconversión de carbohidratos vía glicólisis, y la transaminación de algunos aminoácidos. Asimismo, otra fuente de acetil-CoA, corresponde a la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. Ver Figura 7.

Además de la función bioquímica del acetil-CoA dentro del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), también tiene otras funciones biológicas de vital importancia, destacando como fuente metabólica de todos los átomos de carbono en la síntesis de ácidos grasos. Adicionalmente, en ciertos organismos vivos, el acetil-CoA junto con acetatoacetil-CoA y agua, se condensa mediante la acción enzimática de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, (HMGR, EC 1.1.1.34) para formar hidroximetilglutaril-CoA, precursor de las GAs vía la ruta del mevalonato (Woitek y col., 1997). Ver Figura 4. HMGR, es la primer enzima específica para la síntesis de isoprenoides, incluyendo diversas clases de metabolitos primarios y secundarios tales como, esteroides, quinonas, carotenoides y GAs (Tudzynski, 2005). Woitek y col., en 1997, publicaron la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la HMGR de *G. fujikuroi*.

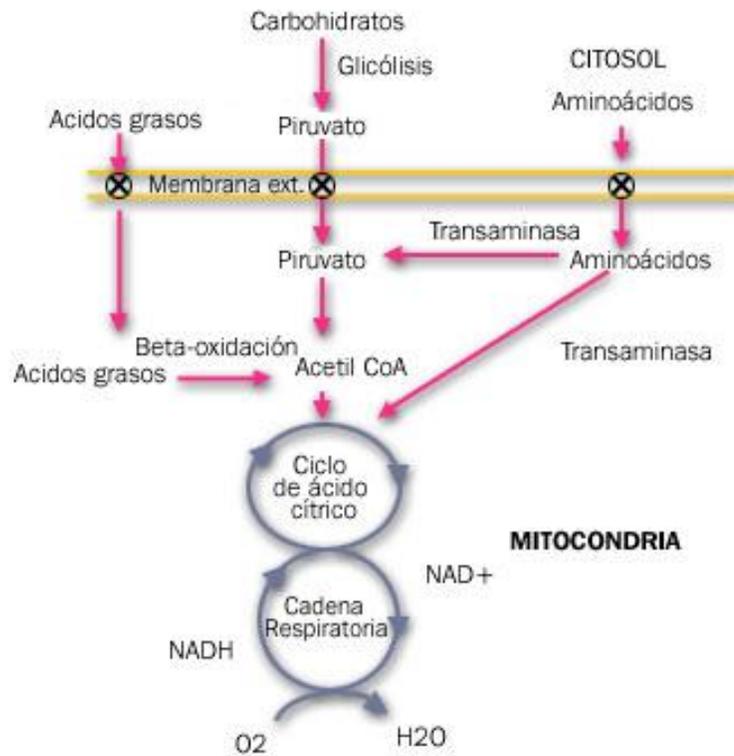


Figura 7. Acetil-CoA: intermediario central del metabolismo oxidativo.

En el hongo *G. fujikuroi*, la biosíntesis de bikaverina, fusarina C, ácidos grasos y giberelinas, tienen al acetil-CoA como un precursor común, a través de las rutas biosintéticas: policétido, ácido graso y terpenoide, respectivamente; como se muestra en la Figura 8. Las condiciones de cultivo juegan un papel principal en la canalización de acetil-CoA en la biosíntesis de estos diferentes compuestos (Giordano y Domenech, 1999).

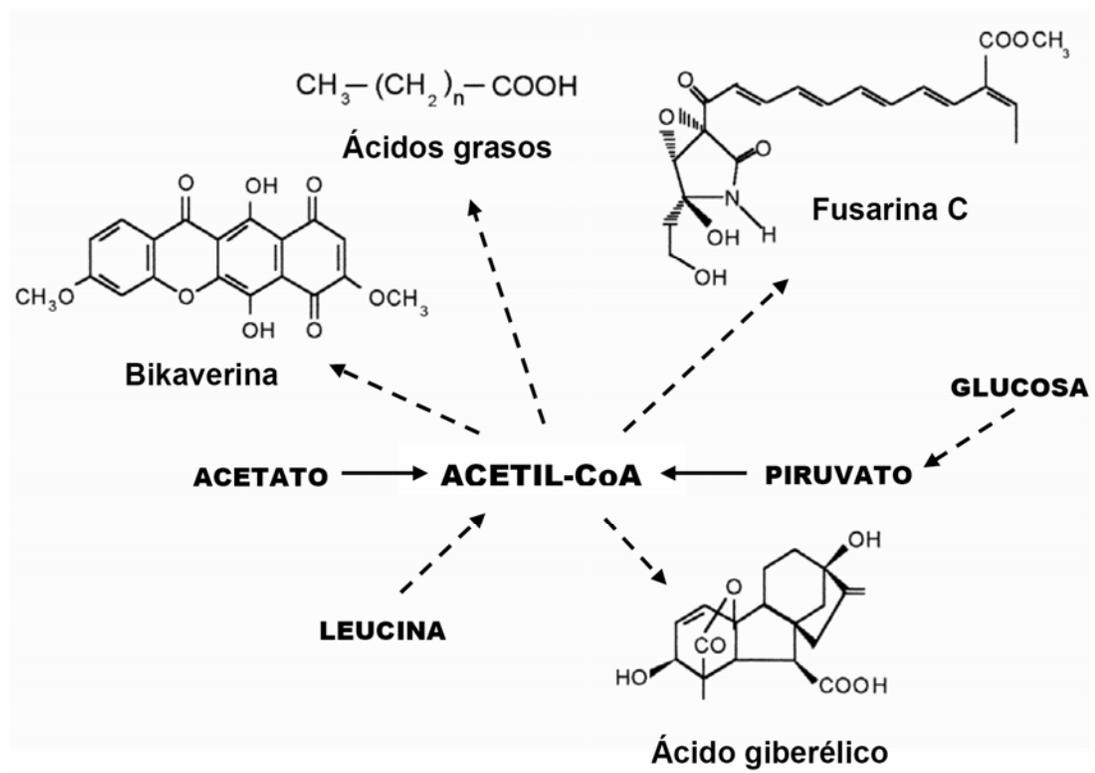


Figura 8. Acetil-CoA precursor para la biosíntesis de ácido giberélico, ácidos grasos, fusarina C y bikaverina. Se muestran también algunas fuentes de acetil-CoA (Giordano y Domenech, 1999).

### III. JUSTIFICACIÓN

El metabolismo de un microorganismo es sumamente complejo debido a la diversidad de reacciones bioquímicas y enzimáticas que es capaz de llevar a cabo. Por ello, los estudios bioquímicos e ingenieriles de cualquier proceso biotecnológico siempre serán un motivo de estudio y una interesante propuesta para tratar de obtener datos científicos de dicho fenómeno. La obtención de GA<sub>3</sub> producto del metabolismo secundario de *G. fujikuroi* no es la excepción, ya que debido a su gran importancia agro-industrial, desde su descubrimiento no ha dejado de analizarse su producción microbiológica. Las diversas investigaciones sobre GAs demuestran la acción que estas hormonas ejercen en todas las fases de desarrollo y crecimiento de las plantas, desde la germinación de la semilla hasta la senescencia. En esta investigación se estudiará el efecto de usar una fuente de carbono mixta en la producción de GA<sub>3</sub> por *G. fujikuroi*, lo cual, podría permitir la implementación de estrategias alternativas para mejorar la producción de esta fitohormona, en particular a maximizar la producción específica, y a minimizar el tiempo de cultivo.

### IV. HIPÓTESIS

La utilización de una fuente de carbono mixta, i.e., glucosa-aceite mejorará la producción específica de GA<sub>3</sub> por *G. fujikuroi*.

## V. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

Investigar el efecto de una fuente de carbono mixta (glucosa/aceite), en la producción de GA<sub>3</sub> por *G. fujikuroi* en un sistema de fermentación sumergida por lotes, utilizando un biorreactor de tanque agitado.

### 5.2. Objetivos Específicos

1. Estudiar las cinéticas de producción de GA<sub>3</sub> cuando se usan fuentes de carbono mixtas con diferentes proporciones de los componentes.
2. Comparar la máxima producción de GA<sub>3</sub> para cada fuente de carbono mixta, con la obtenida en fermentaciones con una sola fuente de carbono y validar estadísticamente la o las diferencias.
3. Evaluar el efecto que ejerce la fuente de carbono sobre la biosíntesis de GA<sub>3</sub>.
4. Cuantificar los ácidos grasos provenientes de la hidrólisis del aceite de maíz mediante cromatografía de gases.
5. Obtener los consumos acumulados de los ácidos grasos presentes en el aceite de maíz, mediante cálculos estequiométricos.
6. Verificar la existencia de mecanismos de regulación en el transporte de ácidos grasos libres al interior de las células por efecto de la presencia de glucosa.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Material biológico

Se utilizó la cepa *Gibberella fujikuroi* CDBB H-984, obtenida de la Colección Nacional de Cultivos Microbianos del CINVESTAV-IPN, México. El hongo se conservó en tubo inclinado de agar papa dextrosa (PDA) a 4 °C y se resembró cada dos meses.

### 6.2. Métodos

La metodología aplicada para desarrollar este proyecto de investigación, se esquematiza en el Cuadro 3 y a continuación se detallan los procedimientos utilizados:

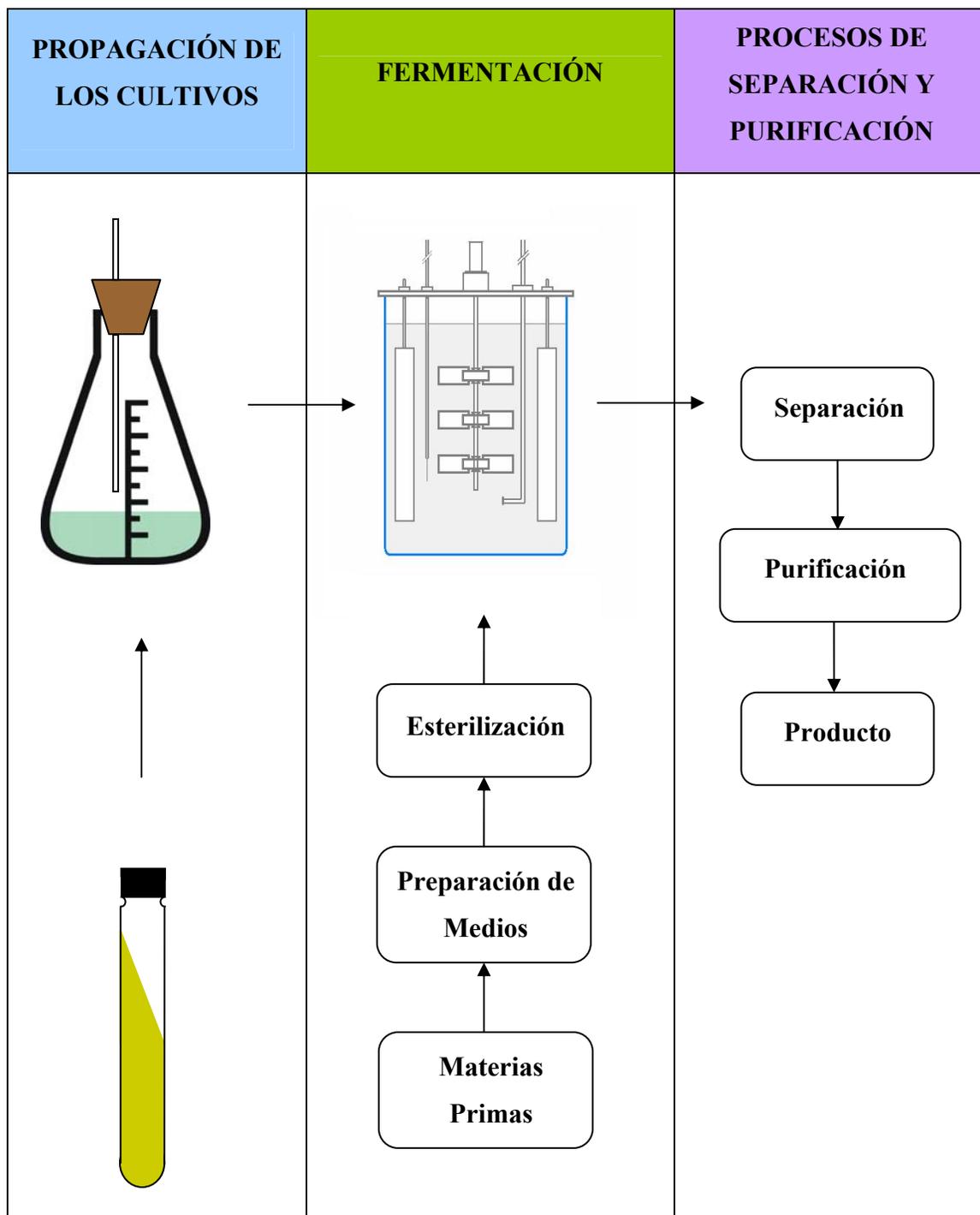
#### 6.2.1. Preparación de medios de cultivo

Medio PDA. En 250 mL de agua desionizada caliente se añadió poco a poco 9.75 g de medio de cultivo PDA comercial (Bioxon) para evitar la formación de grumos. Una vez disueltos completamente se dejó hervir durante 1 min. El medio se distribuyó en porciones de 5 mL en tubos de ensaye con taparosca de 10 mL de capacidad.

Medio de propagación. Se disolvió en agua desionizada los siguientes componentes: 20 g de glucosa, 3 g de extracto de levadura, 2.5 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 1 g de  $\text{CaCO}_3$ . Se aforó a un litro. Este medio de cultivo empleado para la preparación del inóculo es reportado por Escamilla y col., (2000).

Medio de fermentación. Se utilizó la fuente de carbono mixta (glucosa-aceite de maíz marca Mazola,  $\rho = 0.912 \text{ g mL}^{-1}$ ), en base a  $40 \text{ g L}^{-1}$  de C total. La proporción glucosa/aceite se usó a tres niveles distintos: proporción 1:1,  $20 \text{ g L}^{-1}$  C glucosa ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ) :  $20 \text{ g L}^{-1}$  C aceite ( $27.4 \text{ g L}^{-1}$ ); proporción 2:1,  $26.7 \text{ g L}^{-1}$  C

Cuadro 3. Esquema general del proceso de fermentación.



glucosa (66.5 g L<sup>-1</sup>): 13.3 g L<sup>-1</sup> C aceite (18.2 g L<sup>-1</sup>); y 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 aceite (36.4 g L<sup>-1</sup>). Ver cuadro 4. Además se realizaron los experimentos utilizando solo glucosa como fuente de carbono (100 g L<sup>-1</sup>) y solo aceite de maíz como sustrato (54.8 g L<sup>-1</sup>). Como medio basal se utilizó 2 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl, 3 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 solución de oligoelementos. Dicha solución contiene (g L<sup>-1</sup>): 1.0 FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 1.5 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0.2 MnSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O and 1.0 ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O.

Todos los medios anteriores se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 15 lb/plg<sup>2</sup>.

### **6.2.2. Mantenimiento de la cepa**

Una vez que solidificó el medio PDA en los tubos inclinados se procedió a resembrar con 100 µL de una resuspensión homogénea de micelio del hongo *G. fujikuroi*, la cual se realizó por la adición de 5 mL de solución salina al 0.9% a un tubo inclinado con PDA, con la ayuda de un asa microbiológica. El crecimiento se desarrolló durante 6 días a 27 °C de incubación.

### **6.2.3. Condiciones de cultivo**

El micelio desarrollado en un tubo inclinado con PDA se removió utilizando 5 mL de una solución isotónica de NaCl (0.9%) y la suspensión resultante se homogenizó. El inóculo a usar en los experimentos en el biorreactor se preparó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL 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 temperatura y agitación (CRODE). Para los experimentos se utilizó un biorreactor de tanque agitado (Applikon, de capacidad de 7 L). Ver Figura 9. Esta equipado con sensores de pH, T y oxígeno disuelto, para controlar y monitorear esas variables. También, cuenta con bombas peristálticas las cuales se emplean para la alimentación del medio de cultivo, controlar el pH y retirar la muestra. La

composición del medio de cultivo que se utilizó en cada experimento dependió del diseño de experimentos propuesto como se muestra en el cuadro 4; pero en todos los tratamientos las condiciones de cultivo fueron las mismas. El medio de cultivo se esterilizó por separado en contenedores adecuados. También se procedió a esterilizar el biorreactor y todas las mangueras necesarias para su conexión; una vez estéril el biorreactor y a temperatura de laboratorio se procedió a cargar el medio de cultivo. Ya controlados la temperatura de 29 °C, pH 3.5, agitación 600 rpm y una tasa de aireación de 1 vvm (volumen de aire / volumen de medio / minuto), se procedió a la inoculación. El medio de cultivo de 3800 mL contenido en el biorreactor, fue alimentado con 200 mL de inóculo, esto es, una relación del 5 % inóculo respecto al medio de cultivo. Los procesos anteriormente descritos fueron realizados en condiciones estériles, para asegurar un cultivo puro de *G. fujikuroi*.

Cuadro 4. Diseño experimental

Tratamiento	Factor
	Proporción de la fuente de carbono
1	1:1
2	2:1
3	1:2

#### 6.2.4. Toma de muestra

Durante cada uno de los procesos fermentativos realizados se procedió a retirar por duplicado un volumen de 10 mL, en tubos graduados cónicos para centrífuga. Dichas muestras se tomaron a la hora inicial de la fermentación y cada 12 h durante las primeras 72 h del proceso fermentativo, posteriormente el intervalo de muestreo se realizó cada 24 h hasta finalizar con las 360 h de cultivo del microorganismo.

Inmediatamente después de tomar las muestras se realizó su tratamiento y análisis.



Figura 9. Biorreactor de tanque agitado utilizado durante los experimentos.

### 6.2.5. Determinación de aceite

La cantidad de aceite no consumido durante las fermentaciones, se determinó de la siguiente manera: cada una de las muestras de 10 mL se centrifugó a 4000 rpm (Centrífuga 5810 R Eppendorf) durante 20 min. Los lípidos del aceite de maíz (triacilglicéridos y ácidos grasos libres) contenidos en la parte superior del tubo de centrifuga se procedió a extraerlos con hexano (Folch y Col., 1957), y se determinó gravimétricamente. A cada tubo se agregaron 10 mL de hexano y se agitó ligeramente para extraer el aceite separado por la centrifugación; se recuperó el hexano con el aceite con la ayuda de una pipeta

Pasteur en un tubo de ensaye de 50 mL de capacidad. A cada muestra se le realizó una segunda extracción con 10 mL de hexano, se agitó ligeramente, y la fracción se recuperó y combinó en el tubo de ensaye. En un matraz balón a peso constante (90 °C durante 4 h) y con su peso previamente registrado ( $P_1$ ), verter con sumo cuidado el contenido del tubo de ensaye, posteriormente, se agregó 5 mL de hexano al tubo, se agitó y se añadió en el matraz para asegurar que todo el aceite extraído con el hexano sea cuantificado. Se procedió a retirar el solvente de las muestras colectadas en el matraz balón en un rotavapor (Laborota 4000) aplicando vacío y a una temperatura de 37 °C. El matraz balón, que contiene el aceite recuperado de la muestra se deja reposar durante una hora a temperatura de laboratorio, tiempo después se lleva a peso constante nuevamente durante 12 h a 60 °C (es importante controlar este valor de la temperatura para que no se degraden los ácidos grasos libres provenientes de la hidrólisis enzimática del aceite de maíz). Registrar el segundo peso del matraz balón ( $P_2$ ). Los cálculos del aceite de maíz no consumido se realizan de la siguiente manera:

$$\text{Aceite no consumido} = (P_2 - P_1) / V$$

donde:

$P_1$  = peso del matraz (g)

$P_2$  = peso del matraz + la muestra (g)

$V$  = volumen de la muestra (L)

#### **6.2.6. Determinación de Biomasa**

La biomasa de *G. fujikuroi* se determinó gravimétricamente en la muestra libre de aceite. Primero, se etiquetaron y se pusieron a peso constante membranas Millipore de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (90 °C durante 4 h). Posteriormente, se colocaron en un desecador durante 20 minutos y se registró el peso de las membranas ( $P_1$ ). La muestra libre de aceite se filtró bajo presión reducida (bomba LABOPORT) a través de la membrana, después de secarla hasta peso constante a las mismas condiciones ya descritas anteriormente se registró su segundo peso ( $P_2$ ). El filtrado se recuperó y

se conservó a 4 °C para posteriores análisis. Los cálculos del crecimiento del hongo se realizaron de la siguiente manera:

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

donde:

$P_1$  = Peso del filtro (g)

$P_2$  = Peso del filtro + muestra (g)

$V$  = Volumen de la muestra (L)

### **6.2.7. Cuantificación de glucosa**

Se determinó mediante la técnica del ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959), método colorimétrico usado para la cuantificación de azúcares reductores, utilizando un espectrofotómetro de doble haz (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis). Por cada muestra tomada del proceso fermentativo, se colocó en un tubo de reacción 1 mL de filtrado, se agregó 1.5 mL del reactivo de Miller (ver apéndice A) e incubó durante 10 minutos en agua hirviendo. Pasado el tiempo de reacción, los tubos se sacaron inmediatamente del agua y a cada uno de ellos, se le adicionó 1 mL de sal de Rochelle (ver apéndice A). Posteriormente la reacción se paró por choque térmico al introducir los tubos en agua a punto de congelación. Pasados 5 minutos, sacar los tubos del agua y a cada uno de ellos, adicionar 2 mL de agua destilada. Una vez que la reacción llegó a temperatura de laboratorio se procedió a leer su absorbancia a 575 nm contra un blanco tratado a las mismas condiciones de la muestra, usando agua destilada en igual del filtrado. 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 (ver apéndice B).

### **6.2.8. 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 complejo ácido que se reduce a un

complejo intensamente colorido, azul de molibdeno. Se utilizó un espectrofotómetro de doble haz (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis). En un tubo de reacción, se colocó 5 mL de filtrado (realizar la dilución pertinente si la muestra lo requiere, la absorbancia siempre debe estar entre los límites de la curva de calibración), se agregó 200  $\mu$ L de la solución de ácido concentrado de molibdato de amonio (ver apéndice A), se agitó en vortex. Inmediatamente se agregó 200  $\mu$ L de la solución de ácido amino-naftol-sulfónico (ver apéndice A). Los tubos se agitan vigorosamente, se dejan reposar y la lectura de absorbancia a 690 nm se registró a los 5 minutos. Usar como referencia un blanco preparado con 5 mL de agua destilada y tratado a las mismas condiciones de 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 de la muestra usando soluciones de fosfato a concentraciones conocidas (ver apéndice B).

#### **6.2.9. Determinación de nitrógeno**

El nitrógeno amoniacal residual en el caldo fermentativo, se determinó por el método Kjeldahl (AOAC 1990). Además, 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 nitroprusido de sodio. El color azul formado es proporcional a la concentración de amonio (Solórzano, 1969; Presley, 1971). La técnica se detalla a continuación: en un tubo de reacción, colocar 1 mL de muestra filtrada, previamente diluida para que la absorbancia este dentro de la curva de calibración; agregar a cada tubo, 1 mL de reactivo A (ver apéndice A), agitar en vortex, adicionar 1 mL de la solución B (ver apéndice A), posteriormente agregar 2 mL de la solución oxidante D (ver apéndice A), se agitó cada uno de los tubos y se incubó la reacción durante 30 minutos a temperatura de laboratorio, pasado el tiempo, se leyó la absorbancia a 660 nm utilizando un espectrofotómetro de doble haz (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis), calibrando el equipo con un blanco preparado a las mismas condiciones

antes descritas, usando agua destilada en igual de muestra filtrada. La concentración de nitrógeno presente durante cada tiempo de muestreo en el proceso fermentativo, se determinó con el modelo lineal generado por la construcción de la curva de calibración realizada previamente a las mismas condiciones de análisis de la muestra usando soluciones de cloruro de amonio a concentraciones conocidas (ver apéndice B).

#### **6.2.10. Cuantificación de glicerol**

El glicerol liberado durante la lipólisis del aceite de maíz, el 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 mas tarde condensado con amoníaco y 2,4-pentanodiona (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 (ver apéndice A) y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente adicionar 2.5 mL de acetilacetona (ver apéndice A). Inmediatamente después se agitó vigorosamente y se incubó la reacción durante 20 minutos a 50 °C. Pasado el tiempo, se detuvo la reacción por colocar los tubos en agua fría. Una vez que los tubos alcanzaron la temperatura ambiente se procedió a leer la absorbancia a 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 (ver apéndice B).

#### **6.2.11. 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 coloca en un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se ajusta el pH a 2 con

ácido clorhídrico 0.1 M. En seguida, agregar 15 mL de acetato de etilo y un magneto, agitar durante 10 minutos con la ayuda de una placa de agitación. Transferir el contenido del matraz a un embudo de separación, dejar reposar hasta la separación de las fases. Colectar la fase acuosa en el matraz Erlenmeyer y recuperar la fase orgánica, que contiene el ácido giberélico, en un tubo de ensayo de 50 mL. Realizar una segunda extracción agregando 10 mL de acetato de etilo al embudo de separación y mezclarlos con la fase acuosa recolectada en el matraz Erlenmeyer, agitar nuevamente durante 10 minutos. Transferir el contenido del matraz al embudo de separación, dejar reposar hasta la separación de las fases, recuperar la fase acuosa en el matraz Erlenmeyer. La fase orgánica, recuperarla nuevamente en el tubo de ensayo de 50 mL. Agregar 5 mL de acetato de etilo al embudo de separación y recuperarlos en el tubo de ensayo que contiene la fase orgánica. Agregar sulfato de sodio anhidro, en cantidad suficiente, para atrapar los restos de fase acuosa que pudiera haberse ido con la fase orgánica. Agitar y transferir la fase orgánica a un matraz balón de 100 mL limpio y seco, y colocarlo en el rotavapor para eliminar el acetato de etilo, utilizando una temperatura de 30 °C, mediante secado a vacío. Una vez eliminado completamente el solvente, el residuo que quedó en el matraz balón se disolvió con 3 mL de metanol absoluto grado HPLC. La muestra se recuperó en un tubo de ensayo de 8 mL, se cerró herméticamente y se guardó a 0 °C. La muestra está lista para su análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC); tal como lo reporta Negrete-Rodríguez (2002). El GA<sub>3</sub> fue identificado y cuantificado por referencia a un estándar de GA<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich). La cuantificación del GA<sub>3</sub> se realizó utilizando un Cromatógrafo marca Varian con detector UV-Vis de longitud de onda variable 9050; módulo de bomba Varian 9012; automuestreador 9100 y horno de columna Timberline 101. Antes de ser inyectada la muestra al HPLC, se filtró dos veces a través de un filtro de nylon de 13 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro. Las condiciones de operación del Cromatógrafo así como otros datos de la inyección se encuentran en el Cuadro 5.

La cuantificación del GA<sub>3</sub> producido durante cada una de las fermentaciones, se realizó por el área bajo la curva de cada cromatograma del

pico resultante al tiempo de retención de 7.3 min, que corresponde al analito de interés, este tiempo fue corroborado con el estándar de GA<sub>3</sub> grado reactivo (Sigma-Aldrich); con dicho reactivo se realizó la curva de calibración (ver apéndice B), a las mismas condiciones de extracción y análisis de la muestra usando soluciones de GA<sub>3</sub> a concentraciones conocidas y con la ecuación lineal resultante se determinó la concentración del metabolito en cada proceso fermentativo y a cada tiempo de muestreo.

Cuadro 5. Condiciones de operación para la cuantificación de GA<sub>3</sub> por HPLC.

<b>Condiciones de operación</b>	
<b>Detector</b>	UV-Visible, 206 nm
<b>Columna</b>	Chromspher C <sub>18</sub> 25 cm x 4.6 mm DI, 5µm
<b>Temperatura de columna</b>	28 °C
<b>Fase móvil</b>	MeOH / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10mM pH 3 (35/65)
<b>Flujo</b>	1.0 mL/min
<b>Preparación de la muestra</b>	350 µL de muestra/650 µL H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM
<b>Volumen de inyección</b>	60 µL

### 6.2.12. Cuantificación de los ácidos grasos libres

El método usado para la cuantificación de ácidos grasos por Cromatografía de Gases, es rápido, seguro y confiable; El extracto hexánico se disuelve en metanol, así, únicamente los ácidos grasos libres se disuelven, pero no los triacilglicéridos presentes también en el extracto. Los ácidos grasos libres fueron recuperados con 3 mL de metanol absoluto grado HPLC, del matraz balón donde se cuantificaron los lípidos por gravimetría, en un tubo de cultivo roscado de 8 mL, el cual se cerró herméticamente y se dejó reposar por al menos 12 horas a una temperatura de 0 °C para su análisis. Los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis enzimática por la acción catalítica de las lipasas, se identificaron, separaron y cuantificaron utilizando un Cromatógrafo de Gases modelo Varian 3800 con automuestreador y una columna capilar CP-FFAP CB Varian de 25 m de

longitud por 0.53 mm de DI. A temperatura de laboratorio, se tomó 1 mL de muestra del tubo de la parte que se encuentra completamente soluble en metanol, con una jeringa de 3 mL, (algunas muestras presentaron un residuo gelatinizado insoluble, debido a la cantidad de aceite sin hidrolizar recuperado por la extracción con hexano) y se filtró dos veces mediante una membrana de nylon de 13 mm de diámetro y 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y se recuperó en un vial cromatográfico de 2 mL de capacidad, el cual se colocó en el automuestreador y se inyectó automáticamente 1  $\mu\text{L}$  de muestra. Las condiciones de análisis estandarizadas durante este proyecto de estudio para la identificación, separación y cuantificación de los ácidos grasos provenientes de la hidrólisis del aceite de maíz fueron: 200  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 min incrementando a 230  $^{\circ}\text{C}$  a 1  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; temperatura del inyector 260  $^{\circ}\text{C}$ ; detector de ionización de flama a 270  $^{\circ}\text{C}$ ; gas acarreador  $\text{N}_2$  a 5  $\text{mL min}^{-1}$ .

Con estándares grado cromatográfico (Sigma-Aldrich), se realizó la curva de calibración (ver apéndice B) para cada uno de los ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico y linoleico; con la ecuación lineal resultante para cada ácido graso, se determinó la concentración a cada tiempo de muestreo de los ácidos grasos no consumidos en el proceso fermentativo por el área bajo la curva de cada uno de los picos cromatográficos identificados en el cromatograma.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Fermentación a nivel reactor para producción de GA<sub>3</sub>

Se observó una marcada diferencia en la producción de GA<sub>3</sub>, al usar una fuente de carbono mixta con diferentes proporciones de glucosa/aceite de maíz. El inicio de la acumulación de GAs ocurrió más rápido y la concentración alcanzada fue mayor en los cultivos con fuente de carbono mixta con respecto a la fermentación donde se uso solo glucosa como fuente de carbono.

Las figuras 10a y 10b; 11a y 11b; 12a y 12b muestran la evolución de los cultivos que utilizaron fuente de carbono mixta glucosa- aceite de maíz para la producción de GA<sub>3</sub>. La máxima producción de GA<sub>3</sub> se encontró a las 288 h de tiempo de cultivo, sin importar la proporción de glucosa/aceite usada. Sin embargo, la variación de las proporciones de los componentes de la fuente de carbono mixta, afectaron significativamente la producción de GA<sub>3</sub>. Se determinó una producción de 430 mg L<sup>-1</sup>, cuando se utilizó la proporción 1:2 glucosa:aceite de maíz (Figura 12a); 380 mg L<sup>-1</sup> cuando se ensayó la proporción 1:1 glucosa:aceite de maíz (Figura 10a), y 280 mg L<sup>-1</sup> cuando se utilizó la proporción que contenía la mayor cantidad de glucosa (proporción 2:1, Figura 11a). En las gráficas, las barras verticales representan el error estándar del promedio de dos réplicas de cada tratamiento.

En las figuras 10b, 11b y 12b se presentan las cinéticas de consumo de nitrógeno y fosfato. Se puede observar un rápido consumo de ambos nutrientes durante la fase de crecimiento exponencial. En todos los experimentos con fuente de carbono mixta, a las 48 h ya no existe nitrógeno disponible en el medio de cultivo, el crecimiento del hongo se hace más lento y sobreviene la fase de producción de GA<sub>3</sub>. Con respecto al fosfato, se observa que el mayor consumo se da durante las primeras 48 h. También resulta interesante observar que cuando la glucosa se agota en el medio de cultivo cesa la acumulación de biomasa, alcanzándose su máximo valor entre 48 y 120 h, mientras que la máxima producción de ácido giberélico se obtiene después de las 260 h. Todo esto indica que la síntesis de GA<sub>3</sub> no esta asociada al crecimiento microbiano.

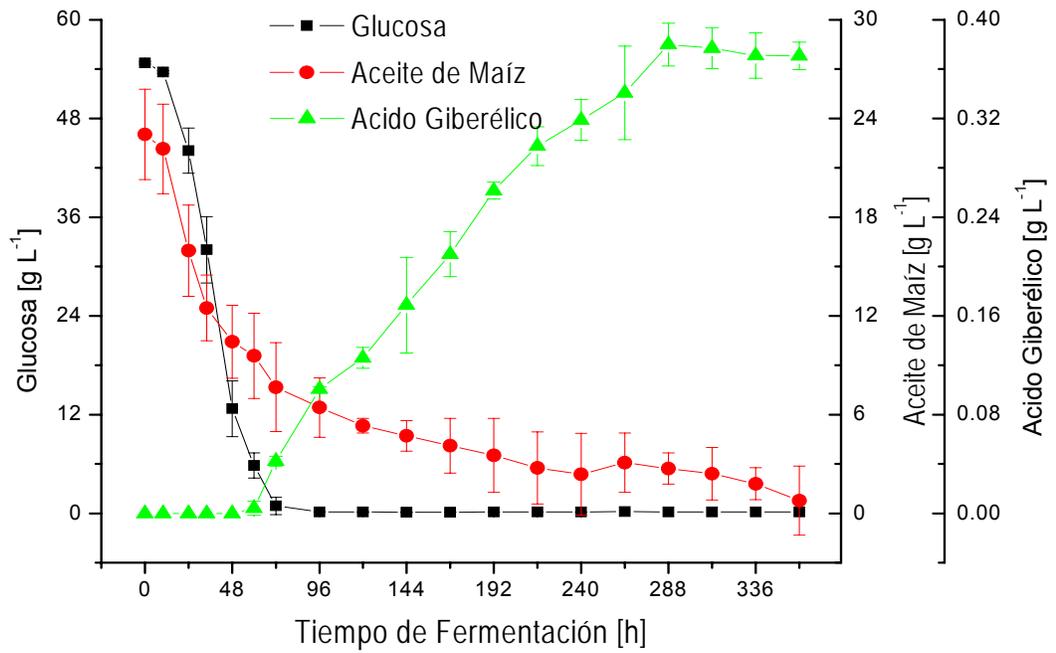


Figura 10a. Producción de GA<sub>3</sub> utilizando la proporción 1:1 glucosa/aceite de maíz en el medio de cultivo

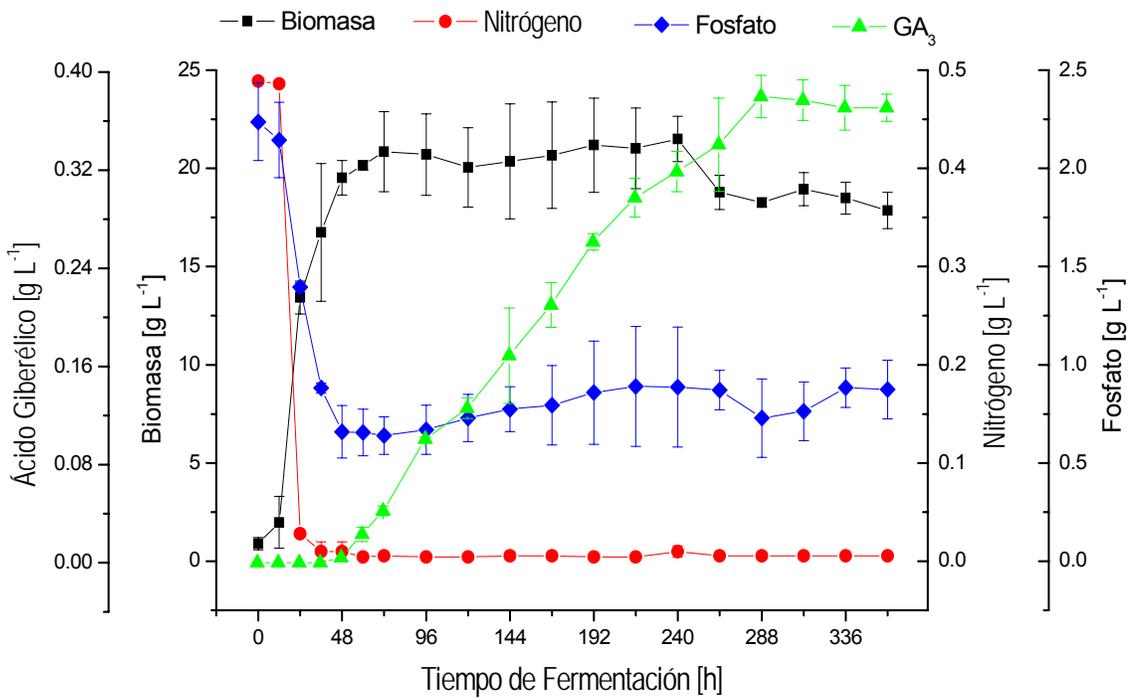


Figura 10b. Cinéticas de producción de biomasa, consumo de nitrógeno y consumo de fosfato utilizando la proporción 1:1 glucosa/aceite con *G. fujikuroi*

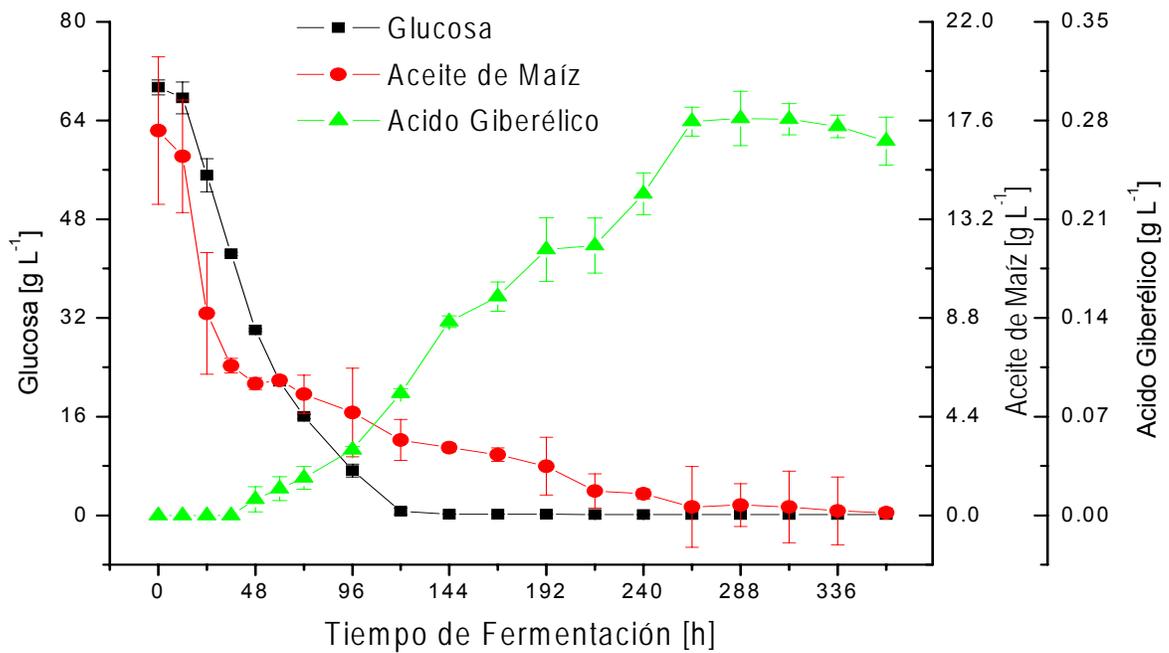


Figura 11a. Producción de GA<sub>3</sub> utilizando la proporción 2:1 glucosa/aceite en el medio de cultivo

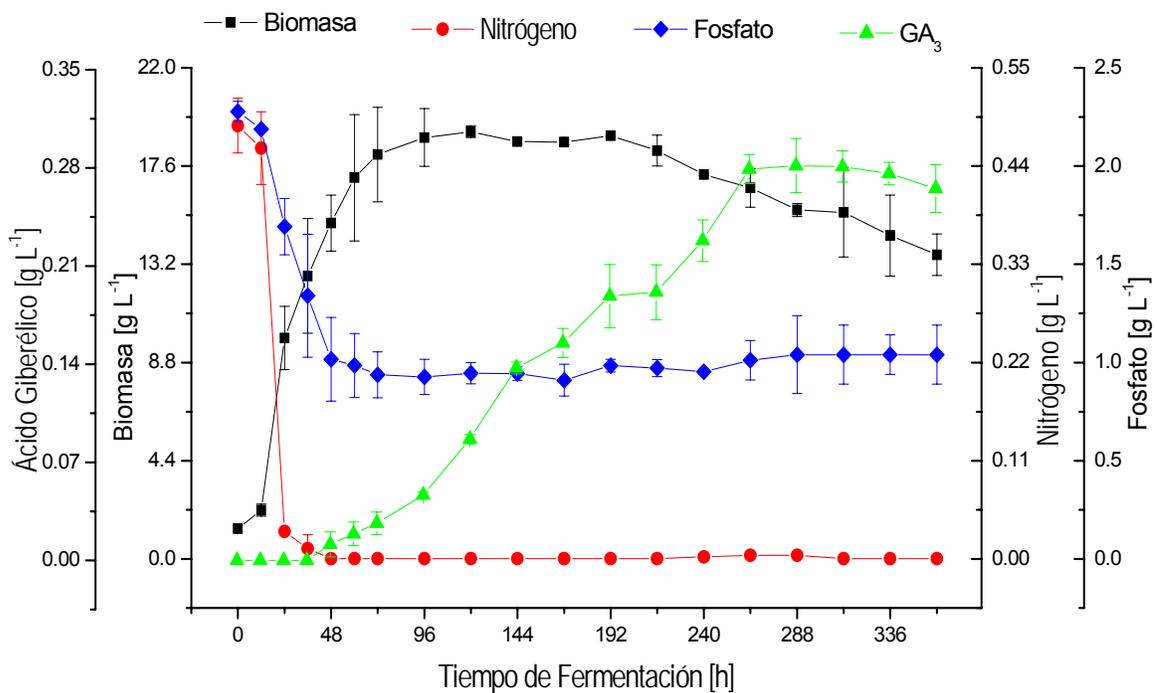


Figura 11b. Cinéticas de producción de biomasa, consumo de nitrógeno y consumo de fosfato utilizando la proporción 2:1 glucosa/aceite con *G. fujikuroi*

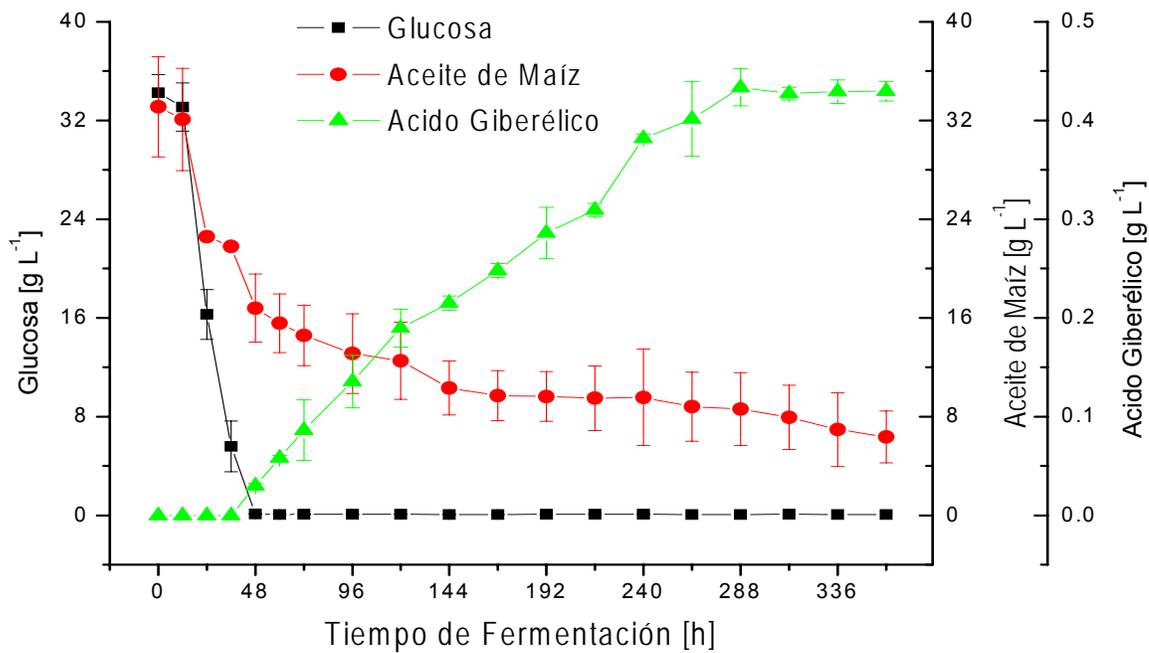


Figura 12a. Producción de GA<sub>3</sub> utilizando la proporción 1:2 glucosa/aceite

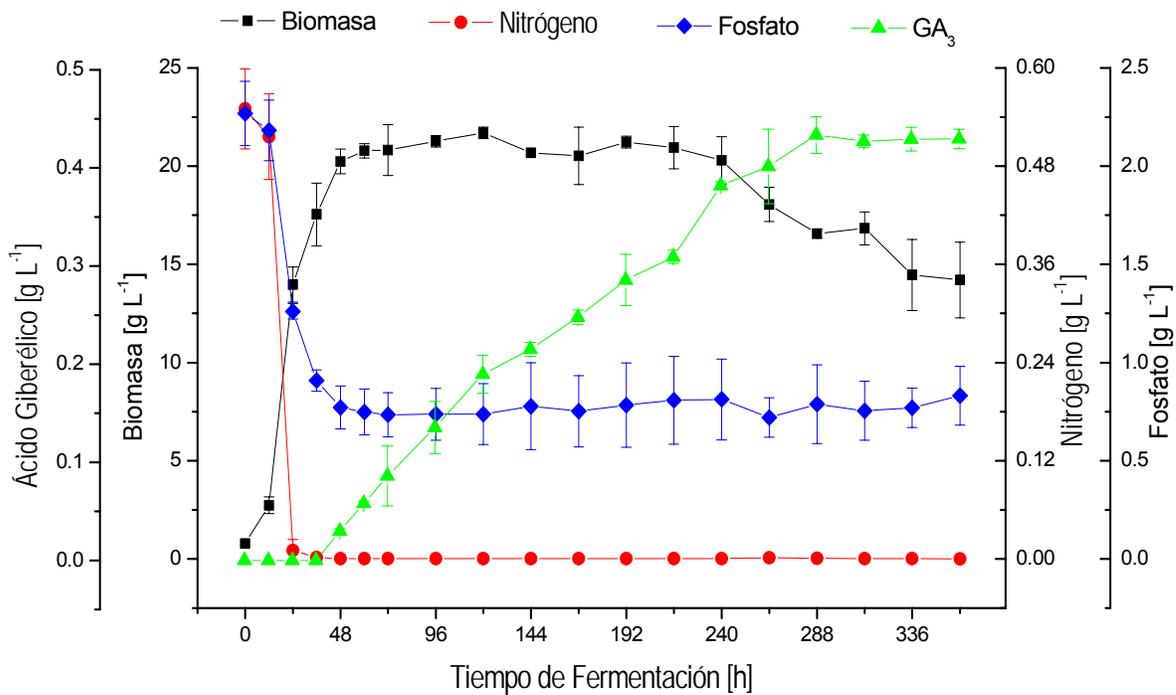


Figura 12b. Cinéticas de producción de biomasa, consumo de nitrógeno y consumo de fosfato utilizando la proporción 1:2 glucosa/aceite con *G. fujikuroi*

Por otro lado, retomando la figura 8, en el hongo *G. fujikuroi*, la biosíntesis de metabolitos secundarios tales como giberelinas, bikaverina, fusarina C y ácidos grasos tienen al acetil-CoA como un precursor común (Giordano y Domenech, 1999). Aspecto que fue abordado en la investigación de Jacklin y col., (2000) sobre *Fusarium moniliforme*, vinculadas al estudio de la interacción existente entre la biosíntesis de ácidos grasos y GAs, los cuales aportaron una novedosa metodología para maximizar la producción del GA<sub>3</sub>, a través de la conmutación metabólica lípido-giberelina. Básicamente, se adicionó sesamol al medio de cultivo, lo que inhibió el metabolismo primario i.e. se redujo la tasa de crecimiento en un 40 % y la acumulación de lípidos en un 35 %. En contraparte, la producción de GA<sub>3</sub> se incrementó 20 veces, alcanzando una producción específica de 63 mg g<sup>-1</sup>. Lo anterior, indica que el acetil-CoA destinado a la biosíntesis de ácidos grasos, es conmutado a la síntesis del metabolito secundario GA<sub>3</sub>. Con esto se puede inferir que en ciertas condiciones, el acetil-CoA podría ser compartido para la síntesis de lípidos y GAs en *F. moniliforme*. Por tanto, en nuestra investigación se estudió la factibilidad de usar una fuente de carbono mixta (como sustituto de un inhibidor de crecimiento), que permita mantener el suministro de acetil-CoA hacia la biosíntesis de GAs por *G. fujikuroi*. Al utilizar el sustrato mixto glucosa-aceite (figura 10a, 11a y 12a), esta investigación busca que los requerimientos de lípidos sean satisfechos por el catabolismo inmediato del aceite, minimizando el uso de acetil-CoA en la biosíntesis de ácidos grasos, y promoviendo así, un mayor flujo de acetil-CoA hacia la producción de GAs. De hecho, Giordano y Domenech (1999), afirman que las condiciones de cultivo juegan un papel principal en la canalización de acetil-CoA en la biosíntesis de giberelinas y ácidos grasos.

A los resultados descritos anteriormente se les aplicó un análisis estadístico (ver apéndice C) y se encontró una diferencia significativa en la producción de GA<sub>3</sub> para los tratamientos propuestos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de varianza utilizando distintas proporciones de fuente de carbono mixta.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Fc</b>	<b>F</b>
Tratamiento	2	0.023758	0.011879	34.8249	9.55
Error	3	$1.023 \times 10^{-3}$	$3.41 \times 10^{-4}$		
Total	5				

En general, el resultado de la ANDEVA es de carácter informativo, su aplicación no es suficiente para un análisis definitivo (Castaño y Domínguez, 2001). Es por ello, además del análisis de varianza se utilizó la prueba de Tukey y la prueba de Dunnett en el análisis de nuestros resultados (ver apéndice C). La prueba de Tukey nos permitió comparar todos los tratamientos por pares (Ver Cuadro 7). En el cuadro 7 se observa que tanto el tratamiento 1 como el 3 presentaron una diferencia significativa con el tratamiento 2 pero entre ellos no existió tal variación.

Cuadro 7. Comparación de medias de GA<sub>3</sub> mediante la prueba de Tukey. Experimentos con fuente de carbono mixta

<b>Comparación de medias</b>	<b>Diferencia producción de GA<sub>3</sub></b>	<b>Valor estadístico de Tukey (T)</b>	<b>Intervalo de confianza</b>	<b>Diferencia significativa</b>
E <sub>3</sub> – E <sub>2</sub>	0.151934	0.07679	$0.151934 \pm T$	<b>SI</b>
E <sub>3</sub> – E <sub>1</sub>	0.05348	0.07679	$0.05348 \pm T$	<b>NO</b>
E <sub>1</sub> – E <sub>2</sub>	0.098454	0.07679	$0.098454 \pm T$	<b>SI</b>

E<sub>1</sub>: media del tratamiento 1 (proporción 1:1); E<sub>2</sub>: media del tratamiento 2 (proporción 2:1);  
E<sub>3</sub>: media del tratamiento 3 (proporción 1:2).

Debido a que el primer intervalo analizado es  $0.075144 < E_3 - E_2 < 0.228724$ , no incluye cero, nos dice 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 en promedio cuando se utiliza la proporción 1:2 (glucosa:aceite de maíz) que cuando se utiliza la proporción 2:1 como fuente de carbono mixta durante el proceso fermentativo con el hongo *G. fujikuroi*.

El segundo intervalo  $-0.02331 < E_3 - E_1 < 0.13027$ , incluye el valor cero, 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 el tratamiento 3 y 1 son iguales estadísticamente para un nivel de significancia de 95% ( $\alpha=0.05$ ).

El tercer intervalo analizado,  $0.021664 < E_1 - E_2 < 0.175244$ , no contiene el valor cero, significa que existe una diferencia significativa en la producción de GA<sub>3</sub> entre los dos tratamientos. Esto se interpreta como que la producción de GA<sub>3</sub> es mayor en promedio cuando se utiliza la proporción 1:1 (glucosa:aceite de maíz) que cuando se utiliza la proporción 2:1 durante el tiempo de cultivo.

El tratamiento con el menor promedio de producción de GA<sub>3</sub> fue el que utilizó la proporción 2:1 (glucosa:aceite de maíz) como fuente de carbono mixta.

## **7.2. Experimentos control**

Las Figuras 13a y 13b muestran la evolución del cultivo control utilizando solamente glucosa como fuente de carbono. El inicio de la síntesis de GA<sub>3</sub> se retrasó significativamente en relación a los cultivos realizados con fuente de carbono mixta (Figura 13a), quizá debido a que al utilizar fuente de carbono mixta, existe la disponibilidad inmediata de los ácidos grasos por la célula microbiana para los requerimientos lipídicos durante su crecimiento. Así también, un aumento en la producción de la fitohormona, debido quizá a que el acetil-CoA producido durante la descarboxilación del piruvato proveniente de la glucólisis, puede ser utilizado para la producción del ácido giberélico. Cuando se utilizó glucosa como única fuente de carbono, el rápido catabolismo de la glucosa se puede desviar a la producción de otros metabolitos secundarios y ácidos grasos (Giordano y Domenech, 1999) y disminuir el flux de acetil CoA hacia el GA<sub>3</sub>. La diferencia

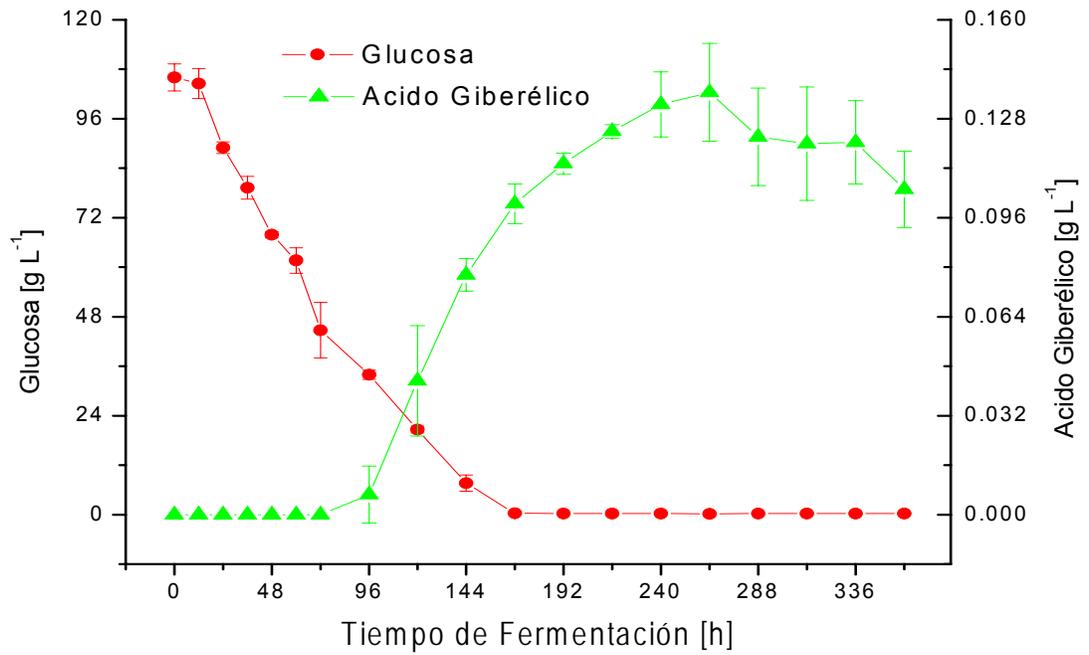


Figura 13a. Producción de GA<sub>3</sub> utilizando glucosa como fuente de carbono

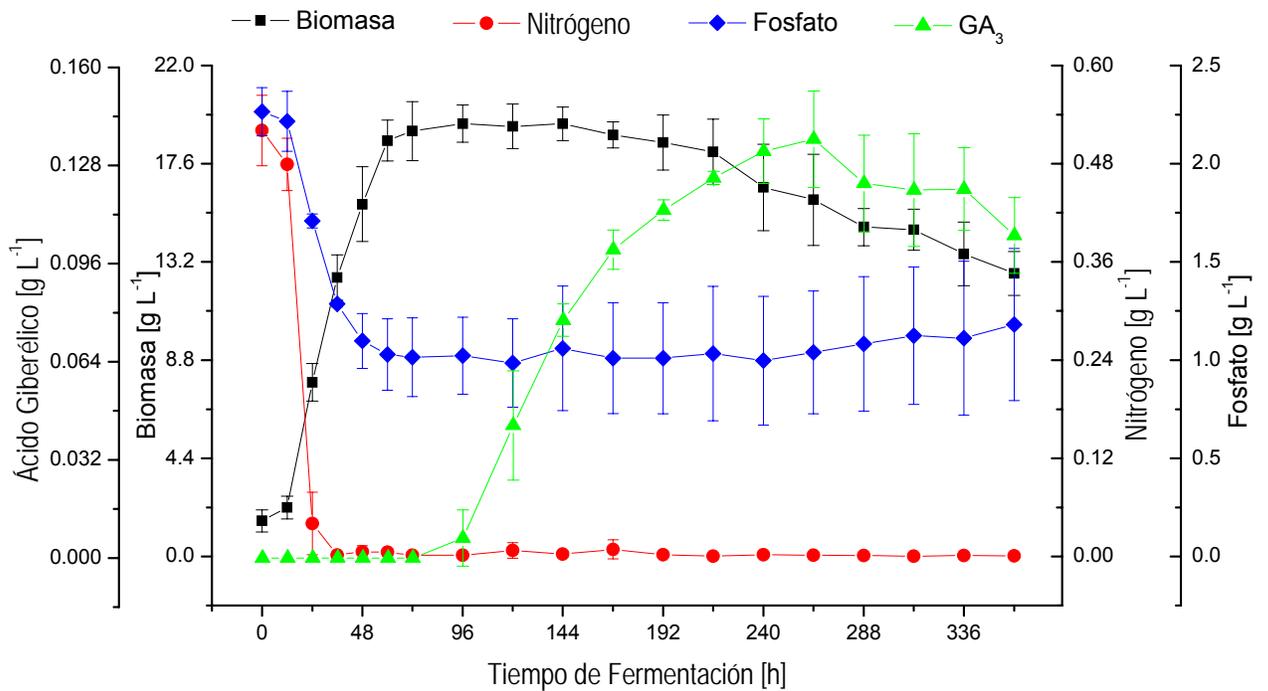


Figura 13b. Cinéticas de producción de biomasa, consumo de nitrógeno y consumo de fosfato utilizando glucosa como fuente de carbono para la producción de GA<sub>3</sub> por *G. fujikuroi*

estadística entre los tratamientos con el control se verificó por la prueba de Dunnett (apéndice C).

La prueba de Dunnett nos permitió comparar los tres tratamientos de fuente de carbono mixta con el tratamiento donde se utilizó solamente glucosa como fuente de carbono (Cuadro 8) y con el tratamiento donde se utilizó solo aceite de maíz como sustrato (Cuadro 9).

Cuadro 8. Comparación de medias de GA<sub>3</sub> mediante Dunnett. Experimentos con fuente de carbono mixta vs. experimento control donde se usó glucosa como fuente de carbono.

<b>Comparación de medias</b>	<b>Diferencia producción de GA<sub>3</sub></b>	<b>Valor estadístico de Dunnett (D)</b>	<b>Intervalo de confianza</b>	<b>Diferencia significativa</b>
E <sub>1</sub> – E <sub>0G</sub>	0.24346	0.05239	0.24346 ± D	<b>SI</b>
E <sub>2</sub> – E <sub>0G</sub>	0.14501	0.05239	0.14501 ± D	<b>SI</b>
E <sub>3</sub> – E <sub>0G</sub>	0.29694	0.05239	0.29694 ± D	<b>SI</b>

E<sub>0G</sub>: media del tratamiento control usando glucosa

Ningún intervalo de confianza del cuadro 8 incluye el valor cero, por lo que los promedios de la producción del metabolito de todos los tratamientos estudiados difieren significativamente con la E<sub>0G</sub> del control (fermentación donde se utilizó solo glucosa como fuente de carbono). Por tanto, es mejor utilizar fuente de carbono mixta para la producción de GA<sub>3</sub> que solamente glucosa.

Como se muestra en las figuras 13a y 13b, la fuente de carbono afecta la producción de GA<sub>3</sub>. Un sustrato rápidamente metabolizado como la glucosa a menudo puede lograr la máxima tasa de crecimiento de células, pero es usual que inhiba la producción de metabolitos secundarios. Esta "represión catabólica" se piensa que es debido a los intermediarios generados por el rápido catabolismo de la glucosa, interfiriendo con las enzimas del metabolismo secundario (Marwick y col., 1999). 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 fermentación bifásica, sin producción durante el crecimiento, sólo durante la fase estacionaria (Marwick y col., 1999).

Las figuras 14a y 14b muestran el desarrollo de cultivos de *G. fujikuroi* utilizando aceite de maíz como fuente de carbono. La producción final de GA<sub>3</sub> del cultivo control con aceite de maíz fue mucho mejor que la obtenida con una fuente de carbono mixta, con proporción 2:1. Esto fue corroborado estadísticamente utilizando la prueba de Dunnett (Cuadro 9). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con la proporción 1:1 de fuente de carbono mixta. En general, los aceites vegetales son fuentes de carbono de lenta asimilación, en consecuencia, no es usual que su metabolismo tenga efectos de represión sobre enzimas biosintéticas. Además, pueden contener precursores naturales de la biosíntesis de GAs (Vass y Jefferys 1979; Tudzynski 1999). El incremento en la producción de GAs cuando se usan aceites vegetales como fuente de carbono, podría atribuirse a que favorecen la disponibilidad de acetil-CoA, aunque también puede deberse a que la solubilidad de oxígeno en ellos es mayor con respecto a la del agua, y por tal razón contribuyen a que se incremente la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (Tudzynski, 1999; Shukla y col., 2003). Pueden comportarse como vectores de oxígeno, favoreciendo la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (Ates y col., 2006; Rols y col., 1990; Rols y Goma, 1991).

Cuadro 9. Comparación de medias de GA<sub>3</sub> de experimentos con fuente de carbono mixta vs. control donde se usó aceite de maíz como fuente de carbono.

Comparación de medias	Diferencia producción de GA <sub>3</sub>	Valor estadístico de Dunnett (D)	Intervalo de confianza	Diferencia significativa
E <sub>1</sub> - E <sub>0A</sub>	0.02161	0.05073	0.02161 ± D	<b>NO</b>
E <sub>2</sub> - E <sub>0A</sub>	- 0.07685	0.05073	- 0.07685 ± D	<b>SI</b>
E <sub>3</sub> - E <sub>0A</sub>	0.07509	0.05073	0.07509 ± D	<b>SI</b>

E<sub>0A</sub>: media del tratamiento control usando aceite

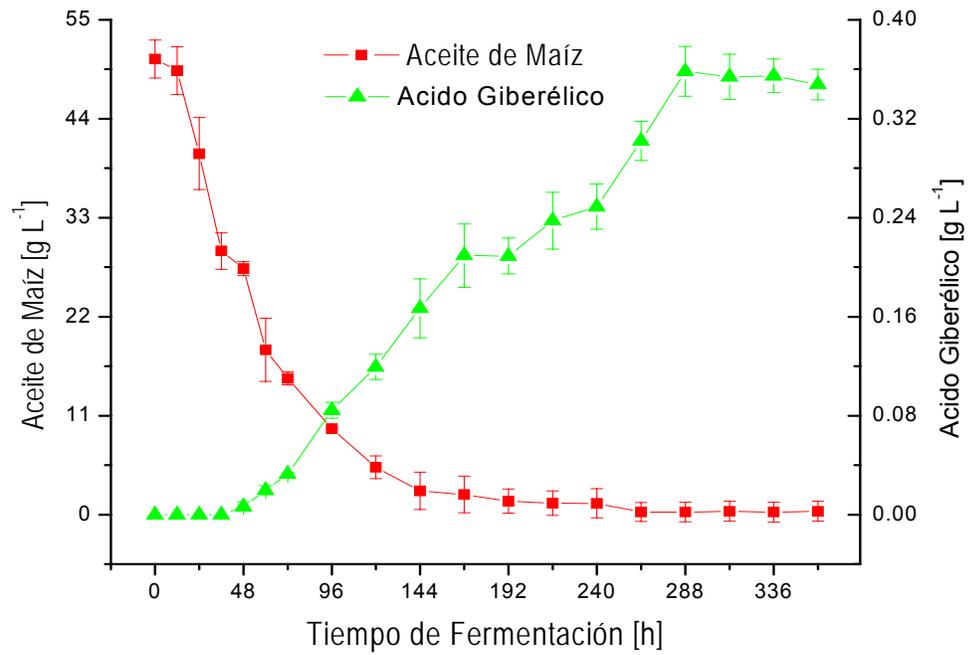


Figura 14a. Producción de GA<sub>3</sub> utilizando aceite de maíz como fuente de carbono

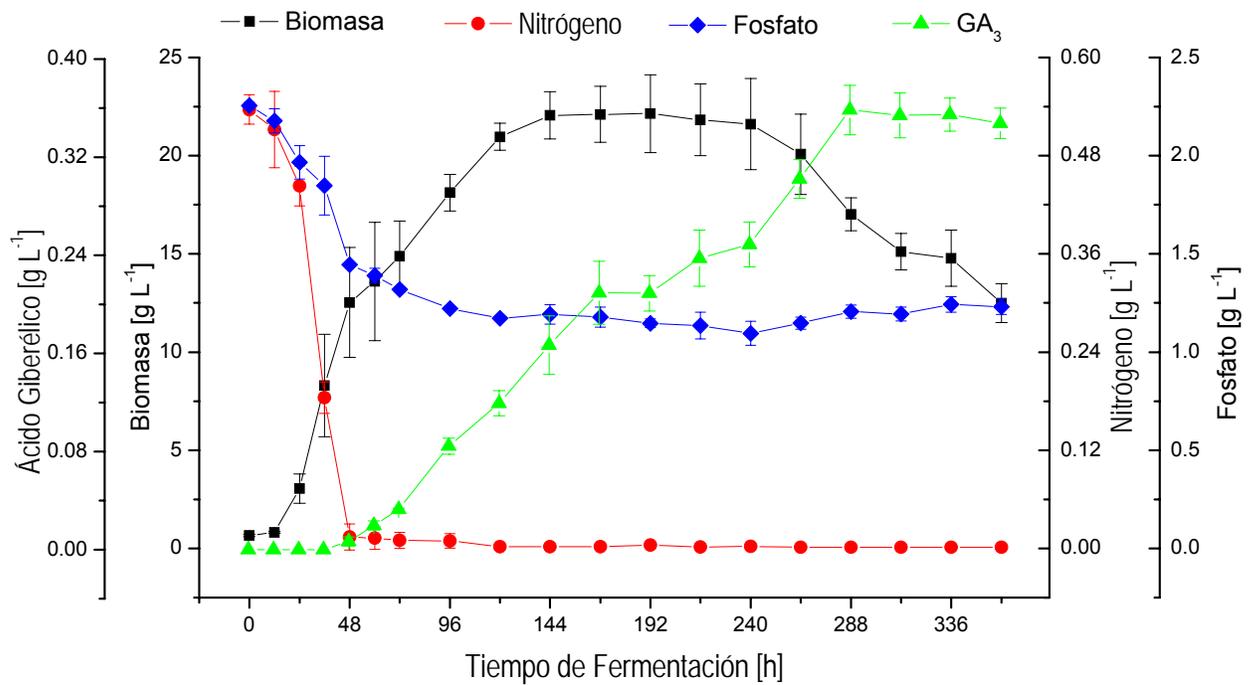


Figura 14b. Cinéticas de producción de biomasa, consumo de nitrógeno y consumo de fosfato utilizando aceite de maíz como sustrato durante el cultivo con *G. fujikuroi*

Del análisis del cuadro 9 podemos concluir que el intervalo de confianza  $0.024359 < E_3 - E_{0A} < 0.125819$  no contiene el valor cero por tanto se infiere que existe una diferencia significativa del promedio de producción de GA<sub>3</sub> del tratamiento 3 con el tratamiento control. Esto es, estadísticamente, el tratamiento 3 (fermentación donde se utilizó la proporción 1:2 glucosa:aceite de maíz) es mejor que el control (fermentación donde se utilizó aceite de maíz como fuente de carbono), para la producción del ácido giberélico bajo las condiciones de estudio.

Como se aprecia en las figuras 10, 11, 12, y 14, el hongo *G. fujikuroi* muestra gran capacidad para adaptarse a medios de cultivo con aceite como fuente de carbono, realizando una rápida metabolización de los mismos, exponiéndolo como una fuente potencial de las enzimas lipasas.

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

En la Figura 15 se aprecia el efecto sobre la producción de GA<sub>3</sub> al utilizar distintas proporciones de glucosa/aceite durante el cultivo de *G. fujikuroi* bajo las condiciones de estudio. Se observa que la fuente de carbono mixta produce un efecto inductivo en la producción de GA<sub>3</sub> y afecta el tiempo de inicio de producción con respecto a la utilización de solo glucosa como fuente de carbono. En el cuadro 10, se dan las concentraciones y rendimiento (mg GA<sub>3</sub>/ g biomasa) alcanzados en cada uno de los experimentos; ambos corresponden al valor máximo de ácido giberélico producido. Se observa que cuando se utilizó glucosa como única fuente de carbono, se obtuvieron los valores mas bajos tanto de producción como de rendimiento; caso contrario fue cuando se utilizó la fuente de carbono mixta 1:2 glucosa:aceite de maíz (tratamiento 3) donde se obtuvieron los mejores resultados de producción de GA<sub>3</sub> (Ver figura 15).

Cuadro 10. Producción máxima de GA<sub>3</sub> durante el cultivo microbiano.

Fermentación	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Control (glucosa)	Control (aceite)
GA <sub>3</sub> , ppm	380	281.5	433.5	136.5	358.4
Rendimiento mg GA <sub>3</sub> / g biomasa	20.80	18.01	26.18	8.54	21.06

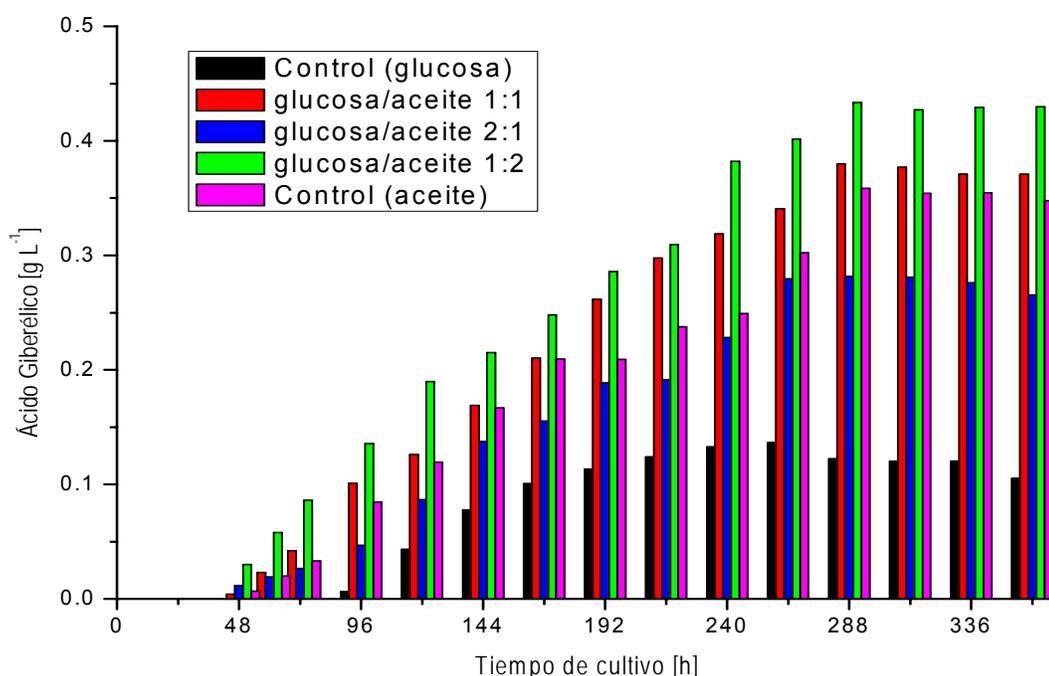


Figura 15. Efecto de la utilización de distintas proporciones de fuente de carbono mixta sobre la producción de GA<sub>3</sub>

De una manera similar al carbono, la fuente de nitrógeno puede regular el metabolismo secundario. La biosíntesis de GAs como metabolitos secundarios en *G. fujikuroi* está regulada por la fuente de nitrógeno, la producción comienza al agotarse ésta en el medio de cultivo (Rybakov y Bourd, 1991; Sánchez-Fernández y col., 1997; Giordano y col., 1999). En las figuras 10b, 11b, 12b, 13b y 14b se puede observar que la fuente de nitrógeno inorgánico es rápidamente consumida por el microorganismo. La producción de GA<sub>3</sub> inicia entre las 48 y 60 h de cultivo,

excepto en la fermentación donde se utilizó solamente glucosa como fuente de carbono (Figura 13). En este último caso, la producción de GA<sub>3</sub> se detectó hasta las 96 h de cultivo, aparentemente debido a la represión catabólica ejercida por glucosa sobre el metabolismo secundario. Todos los experimentos tuvieron un patrón común, no existió fuente de nitrógeno inorgánico durante la producción del metabolito secundario. Escamilla y col., (2000), encontraron que en *G. fujikuroi* el crecimiento exponencial cesa cuando la fuente de nitrógeno asimilable se agota en el medio de cultivo, entonces sobreviene la idiofase con la cual se inicia la formación de GAs.

El fosfato, aunque esencial para el crecimiento, a ciertas concentraciones puede reprimir el metabolismo secundario, inhibiendo por ejemplo, fosfatasas y oxigenasas (Spizek y Tichy 1995). En *G. fujikuroi* la biosíntesis de las GAs aparentemente no esta regulada por la concentración de fosfato o la tasa de crecimiento (Giordano y col., 1999).

#### **7.4. Estudios genéticos en *Gibberella fujikuroi* por nuestro grupo de trabajo**

En estudios previos (Rios-Irube, 2003) se estudió la expresión diferencial de genes del hongo *Gibberella fujikuroi* bajo dos diferentes fuentes de carbono glucosa y aceite de arroz utilizando la técnica despliegue diferencial (DD). Como su nombre lo indica, este método hizo posible desplegar una población completa de ARNm de las células del hongo sujetas a crecimiento con glucosa como sustrato de carbono y comparar su patrón de expresión con la otra población bajo estudio (ARNm procedente de fermentación de *G. fujikuroi* utilizando aceite como fuente de carbono). La hipótesis planteada para dicha investigación fue “Los genes expresados por *G. fujikuroi* dependen del sustrato utilizado durante su crecimiento”. En efecto, encontramos expresión diferencial de genes. De hecho, la principal conclusión de la investigación fue “la expresión de genes en el hongo *G. fujikuroi* depende de la fuente de carbono utilizada durante el cultivo”. Este estudio a nivel molecular del hongo *G. fujikuroi* demostró el impacto genético que con lleva el solo variar la fuente de carbono, encontrando diferencias en la expresión de genes o *patrón genético*.

## 7.5. Análisis y cuantificación de ácidos grasos por Cromatografía de Gases.

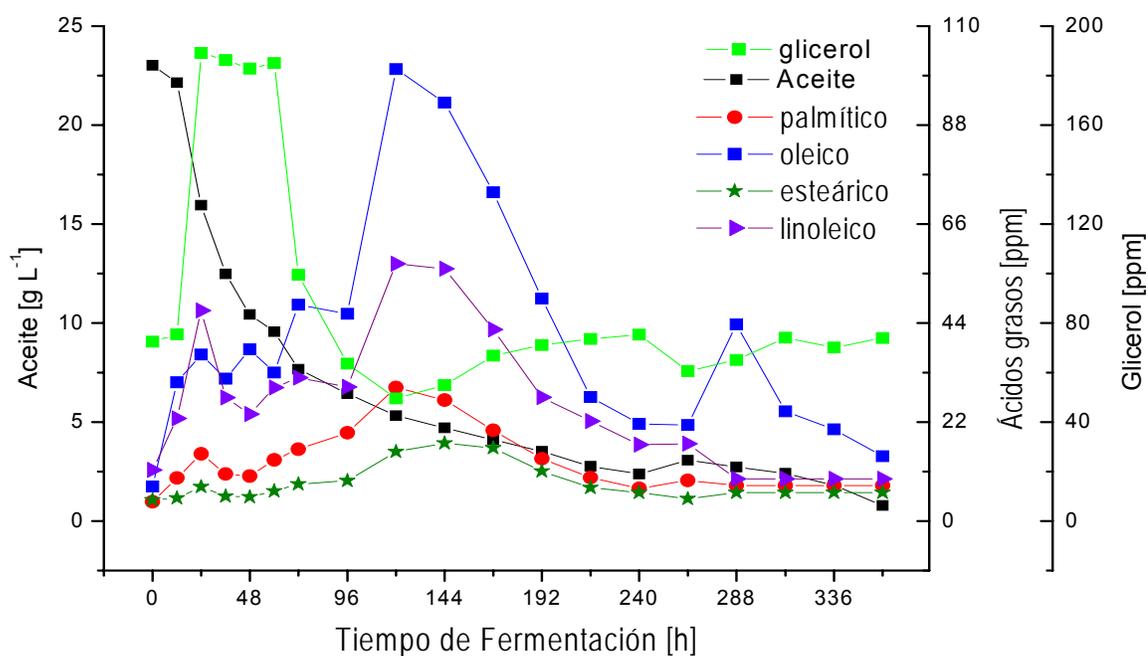
Al realizar los estudios de Cromatografía de Gases en las muestras de aceite a cada tiempo de análisis durante los procesos fermentativos, se encontró la presencia de cuatro señales cromatográficas con alta definición. Se reporta por Badui (1999), que la composición del aceite de maíz contiene un 59.6% de ácido linoleico, 25.4 % de ácido oleico, 10.9 % de ácido palmítico, 2 % de ácido esteárico y 1.2 % de ácido linolénico, entre los más importantes. Por supuesto, se implementó el método de análisis de estos ácidos grasos grado cromatográfico (Sigma) en el Cromatógrafo de Gases. Efectivamente, se identificaron, separaron y cuantificaron los ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico, cuyos tiempos de retención corresponden 14.62 min, 22.36 min, 23.67 min, 25.92 min y 28.89 min respectivamente. Al utilizar el método del estándar externo, se comprobó que los picos que se encontraban en mayor proporción en las muestras analizadas correspondían a los principales componentes del aceite de maíz durante el desarrollo de los cultivos. Por tanto, el análisis de ácidos grasos se basó sobre estos componentes principales encontrados en los cromatogramas a cada tiempo de muestreo.

Los análisis de ácidos grasos por Cromatografía de Gases se reportan en la Figura 16, para cada una de las proporciones de fuente de carbono mixta estudiadas. Los ácidos grasos libres son aquellos provenientes de la hidrólisis enzimática de los triacilglicéridos durante la producción del ácido giberélico. La fuente de carbono utilizada durante estas fermentaciones fue aceite de maíz marca comercial Mazola. La concentración de los ácidos grasos se determinó por el método del estándar externo. En la figura 16, se observa que los ácidos grasos linoleico y oleico están presentes en mayor concentración durante el cultivo de *G. fujikuroi*. El ácido linolénico no se detectó en los análisis de CG y por tanto, se asumió que hubo una rápida asimilación de éste ácido graso por el hongo *G. fujikuroi*.

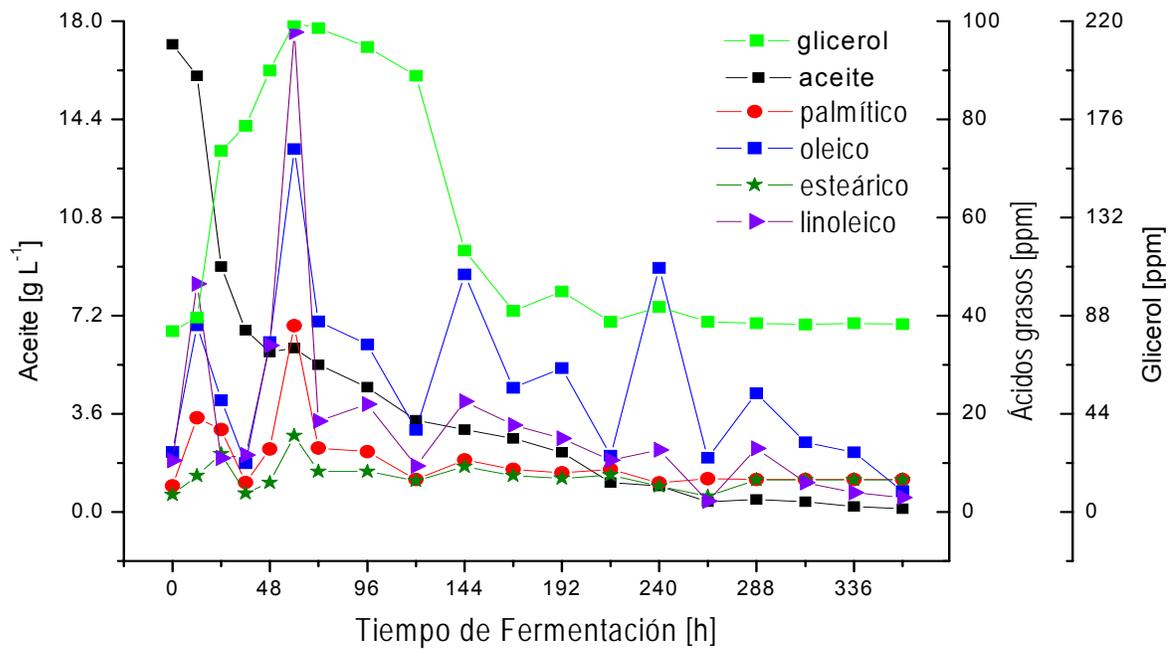
En la Figura 17 se muestran las concentraciones de los ácidos grasos presentes en el cultivo de *G. fujikuroi* utilizando solamente aceite de maíz como

fuente de carbono. Se aprecia una rápida acumulación del aceite de maíz y se muestran las altas concentraciones obtenidas de los ácidos grasos linoleico y oleico, los cuales, son los principales componentes del aceite de maíz.

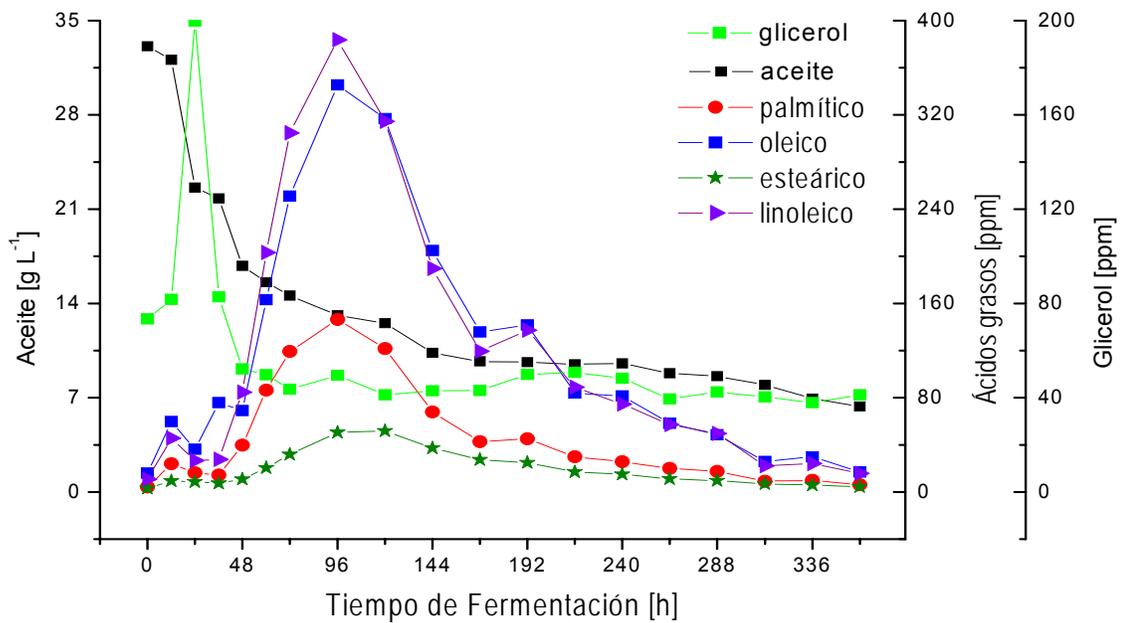
La utilización de aceites naturales necesariamente requiere la producción de enzimas por el hongo *G. fujikuroi*; siendo las lipasas, las enzimas esenciales para la hidrólisis de los aceites. Las lipasas son generalmente enzimas extracelulares que tienen como función biológica, catalizar la hidrólisis reversible de los enlaces éster de triacilglicerol en la interfase lípido-agua, para obtener ácidos grasos y glicerol (Ferrer y col., 2000; Shye-Jye y col., 2000; Bapiraju y col., 2004); y mediante esta transformación bioquímica los lípidos puedan emigrar al interior de las células. Por la capacidad de *G. fujikuroi* de adaptarse a medios de cultivo con aceite como fuente de carbono, lo convierte en una fuente potencial de estos biocatalizadores.



(a)



(b)



(c)

Figura 16. Evolución de los ácidos grasos libres durante el cultivo de *G. fujikuroi*: (a) proporción 1:1; (b) 2:1 y (c) 1:2 glucosa:aceite de maíz

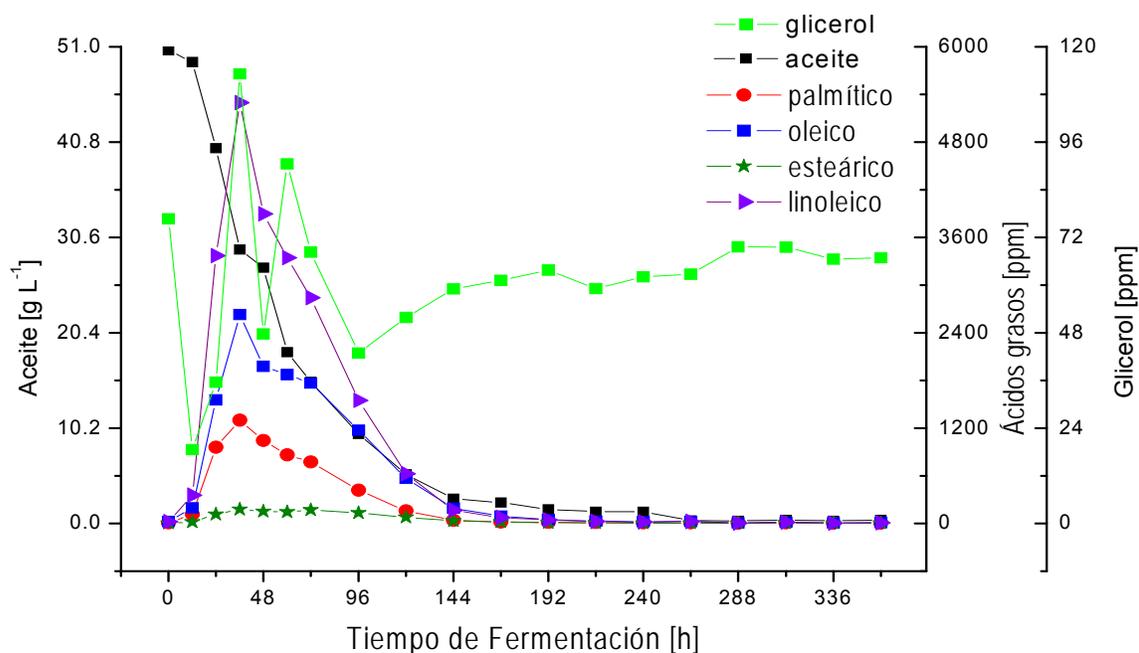


Figura 17. Monitoreo de los ácidos grasos libres presentes durante la fermentación de *G. fujikuroi* utilizando solo aceite de maíz como fuente de carbono

Es importante destacar, que no existen reportes de la producción de lipasas en *G. fujikuroi*, aunque existen varias publicaciones respecto a la producción de lipasas en el género *Fusarium* (Hoshino y col., 1992; Rapp, 1995; Diniz Maia y col., 1999; Knight y col., 2000; Camargo-de-Morais y col., 2003), el cual corresponde a la forma imperfecta de *G. fujikuroi*.

En las Figuras 16 y 17, se observa la concentración de glicerol presente en función del tiempo, el comportamiento errático podría deberse a que el glicerol se produce por la hidrólisis de los triacilglicéridos del aceite de maíz, y a la par se convierte en un sustrato de fácil asimilación por el hongo ya que es una fuente de carbono que es incorporada rápidamente por el metabolismo celular del microorganismo. Existe tanto producción como consumo de glicerol.

### 7.6. Evaluación del efecto de la glucosa sobre la asimilación de ácidos grasos

Respecto a la migración de los ácidos grasos al interior de las células, existen diversos estudios que apoyan la hipótesis de que ésta se realiza mediante

transportadores de ácidos grasos ubicados sobre la membrana celular, a través de un proceso que implica difusión, adsorción, movimiento transmembranal y desorción de los ácidos grasos (Hamilton, 1998); sin embargo, poco se sabe sobre el efecto que tienen las fuentes de carbono en dicha migración.

El desarrollo de este proyecto, aportó valiosa información con respecto a la existencia de mecanismos de regulación en el transporte de ácidos grasos al interior de las células por efecto de la presencia de glucosa, mediante el monitoreo continuo del consumo de ácidos grasos en el sistema fermentativo, debido a que la tasa de consumo de ácido grasos es un índice global de transferencia de estos metabolitos al interior de las células.

Por tanto, la existencia de mecanismo de regulación de esta índole, pudo deducirse de un análisis cinético comparativo de la cinética de consumo de azúcares reductores y la cinética de consumo de ácidos grasos; bajo el supuesto de que la regulación de la glucosa sobre la asimilación de los ácidos grasos, solo compete a los mecanismos de transporte.

Respecto a la suposición de la existencia de un mecanismo de regulación por parte de la glucosa en la asimilación del aceite; en éstas fermentaciones (Figuras 10a, 11a y 12a), se observa que ambas fuentes de carbono fueron metabolizadas rápidamente, lo cual implica que la glucosa no ejerce ningún efecto de represión catabólica sobre las enzimas implicadas en el catabolismo del sustrato aceite de maíz, o alguna clase de control metabólico sobre el transporte de los ácidos grasos libres al interior de las células de *G. fujikuroi*.

Dentro de los organismos vivientes, existen regulaciones catabólicas con el objetivo de minimizar el uso de los recursos energéticos, impidiendo por ello, que el catabolismo de dos o más fuentes de carbono con diferente grado de asimilación, sea ejecutado. Diniz-Maia y col., (1999), observaron que la glucosa inhibe el efecto inductivo del aceite sobre la producción de lipasa extracelular en el hongo fitopatógeno *F. solani* FS1, indicando que la glucosa es un factor de regulación sobre la actividad de las lipasas.

## 7.7. Consumos acumulados de los ácidos grasos

Con los valores obtenidos por cromatografía de gases de los ácidos grasos, el valor obtenido colorimétricamente del glicerol y el aceite no consumido durante el proceso fermentativo obtuvimos estequiométricamente los consumos acumulados de dichos sustratos y los resultados se muestran en las figuras 18, 19, 20 y 21.

El cálculo de las cinéticas de los consumos acumulados de los ácidos grasos se realizó de la siguiente manera:

1. Con los resultados de los análisis químicos aplicados a cada muestra de caldo fermentativo se determinó la cantidad de aceite consumido, por simple diferencia entre el aceite existente en ese instante de tiempo y al inicio de la fermentación.
2. Basados en la composición promedio del aceite de maíz empleado, misma que se muestra en el Cuadro 11, se determinó estequiométricamente la relación de masa liberada de cada ácido graso por unidad de masa de aceite consumido, e incluso la de glicerol liberado que corresponde a 0.0994 g de glicerol generado / g de aceite hidrolizado.
3. Con la determinación previa de las cantidades de cada uno de los ácidos grasos existentes al inicio de cada fermentación y el remanente en cada muestra de caldo fermentativo, se evaluó la cinética del consumo acumulado de cada ácido graso.

Cuadro 11. Principal composición de los ácidos grasos del aceite de maíz.

Ácido graso	Composición	Relación de masa de ácido graso generado / masa de aceite hidrolizado
Linoleico	59.6%	0.5416
Oleico	25.4%	0.2308
Palmítico	10.9%	0.0990
Esteárico	2.0%	0.0181
Linolénico	1.2%	0.0109

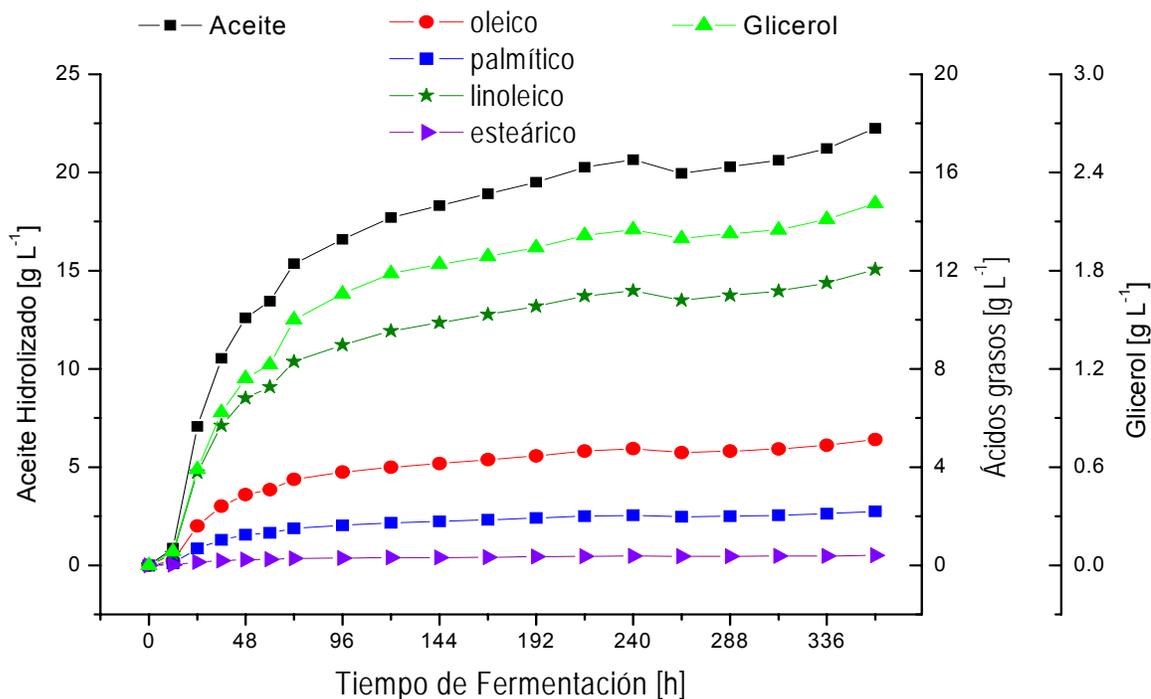


Figura 18. Consumos acumulados de los ácidos grasos al utilizar la fuente de carbono mixta 1:1 (glucosa:aceite de maíz) durante la producción de GA<sub>3</sub>.

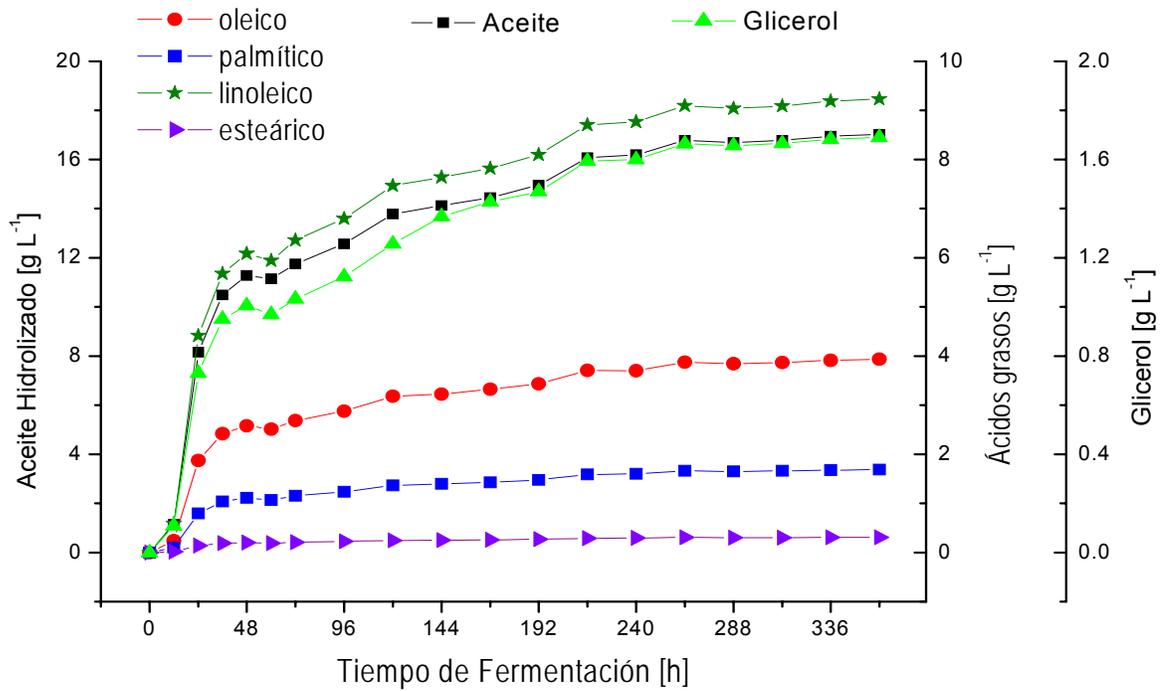


Figura 19. Consumos acumulados de los ácidos grasos al utilizar la proporción de fuente de carbono mixta 2:1 (glucosa:aceite de maíz) durante la producción de GA<sub>3</sub>.

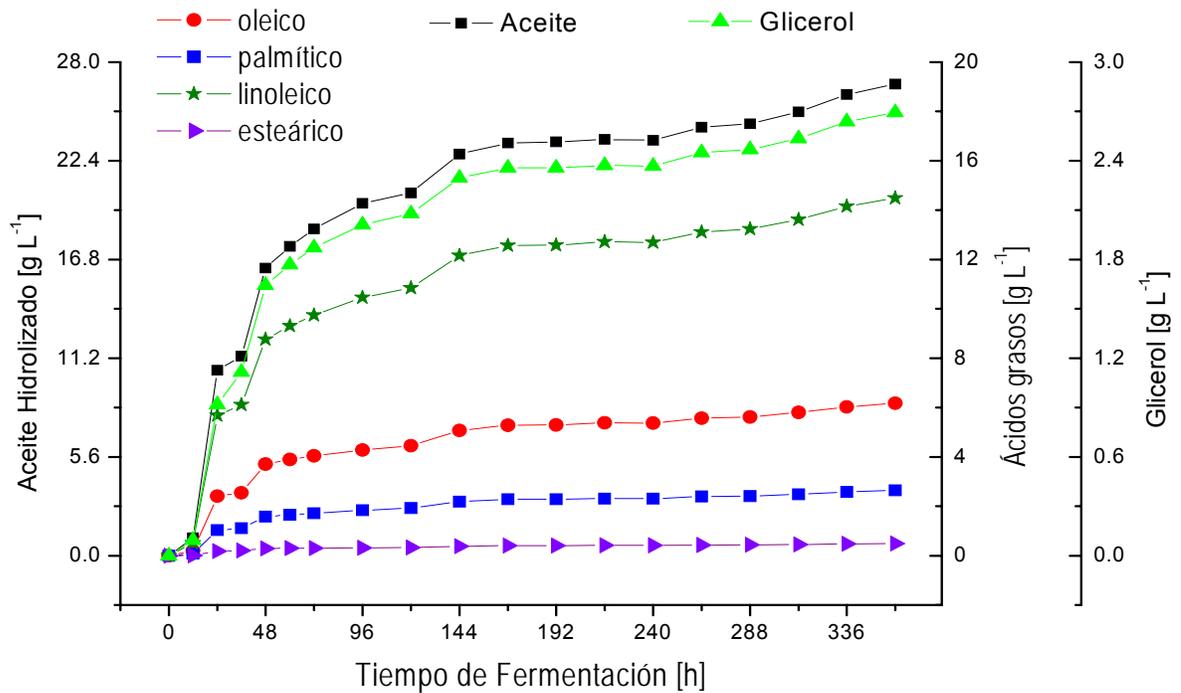


Figura 20. Consumos acumulados de los ácidos grasos al utilizar la proporción de fuente de carbono mixta 1:2 (glucosa:aceite de maíz) por *G. fujikuroi*.

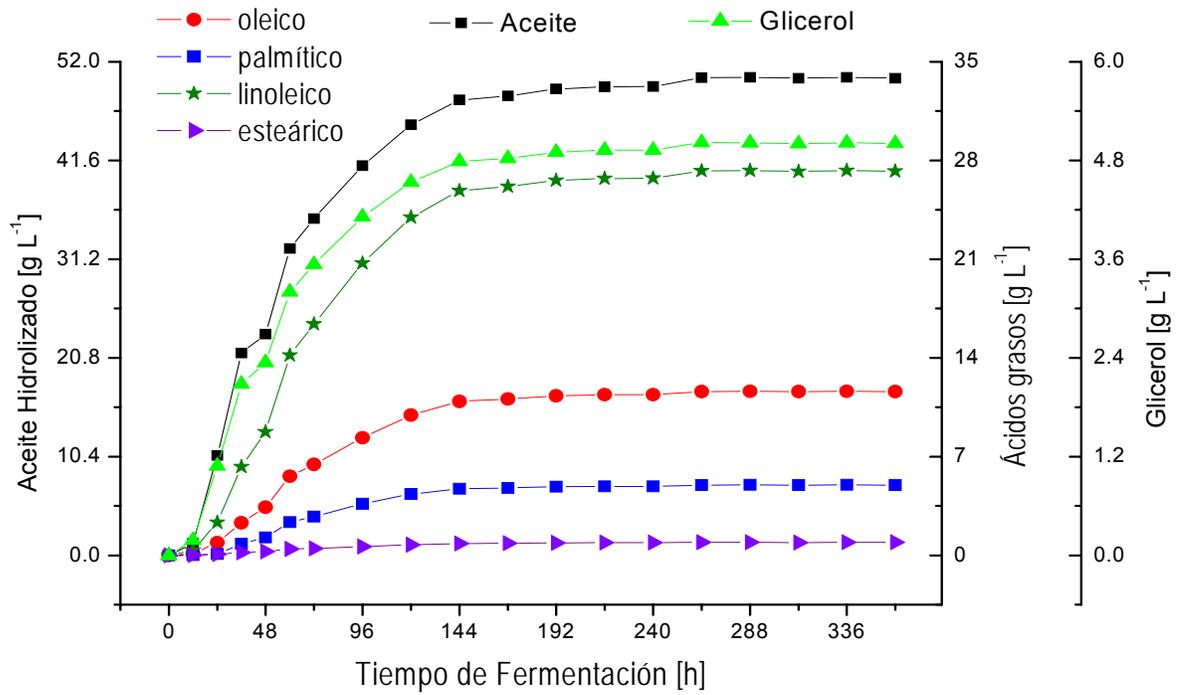


Figura 21. Consumos acumulados de los ácidos grasos al utilizar aceite como fuente de carbono durante la producción de GA<sub>3</sub>.

En las figuras 18, 19, 20 y 21 se puede apreciar que durante la etapa de crecimiento exponencial existe un mayor consumo de aceite y de los cuatro ácidos grasos estudiados por el hongo *G. fujikuroi*.

## VIII. CONCLUSIONES

- La fuente de carbono mixta en las tres proporciones analizadas tienen un efecto inductivo sobre la producción de GA<sub>3</sub> y disminuyen el tiempo de inicio del metabolismo secundario, con respecto a la utilización de glucosa como única fuente de carbono, bajo las condiciones de estudio.
- Se probó estadísticamente que es mejor utilizar una fuente de carbono mixta para la producción de ácido giberélico por *G. fujikuroi*, que solamente glucosa como fuente de carbono.
- Entre las tres proporciones de fuente de carbono mixta que se estudiaron, la mayor producción y rendimiento de GA<sub>3</sub> se obtuvo cuando se utilizó la menor cantidad de glucosa.
- El aceite de maíz estimula la producción de GA<sub>3</sub> por *G. fujikuroi*. Estadísticamente solamente cuando se utilizó la proporción con mayor cantidad de aceite fue mejor que usando solo aceite de maíz durante el cultivo.
- El tiempo de inicio en la producción de GA<sub>3</sub> aumentó cuando se utilizó solo glucosa como fuente de carbono.
- La producción de GA<sub>3</sub> inicia hasta que se agota la fuente de nitrógeno asimilable en el medio de cultivo.
- La velocidad de crecimiento del hongo disminuye al agotarse la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.
- Los fosfatos son indispensables para el crecimiento del hongo *G. fujikuroi*, y para el inicio de la biosíntesis del metabolito secundario.
- La glucosa no ejerce efecto aparente sobre las enzimas implicadas en el catabolismo del sustrato aceite de maíz, o alguna clase de control metabólico sobre el transporte de los ácidos grasos en las células de *G. fujikuroi*, cuando se utiliza fuente de carbono mixta.

- El hongo *G. fujikuroi* muestra gran capacidad para adaptarse a medios de cultivo con aceite como fuente de carbono.
- Se identificaron por CG los ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico y linoleico, cuyos tiempos de retención corresponden 14.62 min, 22.36 min, 23.67 min y 25.92 min respectivamente, durante el monitoreo de la fermentación, a las condiciones de estudio.
- Los cuatro ácidos grasos identificados, fueron metabolizados por el hongo *G. fujikuroi* y su mayor consumo fue durante la etapa de crecimiento exponencial.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Almanza-Rangel, S. 2005. Tesis de maestría: Estudio del efecto de la relación C-N provenientes de harina y aceite de arroz sobre la producción de GA<sub>3</sub>. Instituto Tecnológico de Celaya.
- A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis. 15th Edition of the Association of Official Chemists. Washington, D.C.
- Ates, S., Ozenir, S. y M. Gökdere. 2006. Effect of silicone oil on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* and *Aspergillus niger*. Applied Biochemistry and Microbiology. 42, 5: 500-501.
- Badui D.S. 1999. Química de los Alimentos. Capítulo 4: Lípidos. Addison Wesley Longman. México.
- Bapiraju K.V.V.S.N., Sujatha P., Ellaiah P., Ramana T. 2004. Mutation induced enhanced biosíntesis of lipase. Afr. J. Biotechnol. 3(11): 618-621.
- Bennett W.J. 1995. From molecular genetics and secondary metabolism to molecular metabolites and secondary genetics. Can. J. Bot. 73(1): S917-S924.
- Berríos J., Illanes A. & Aroca G. 2004. Spectrophotometric method for determining gibberellic acid in fermentation broths. Biotechnology Letters. 26: 67-70.
- Borrow A., Brown S., Jefferys E.G. Kessel R.H.J., Lloyd E.C., Lloyd P.B., Rothwell A., Rothwell B., Swait J.C. 1964. The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. Can. J. Microbiol. 10: 407-444.
- Brückner B. and Blechschmidt D. 1991a. The gibberellin fermentation. Critical Reviews in Biotechnology 11(2): 163-192.
- Brückner, B. y D. Blechschmidt. 1991b. Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Applied Microbiology and Biotechnology, 35 (5): 646-650.
- Brückner, B., Blechschmidt D. y R.D. Recknagel. (1991). Optimization of nutrient medium for biosynthesis of gibberellic acid. Journal Basic Microbiology, 31: 243-250.
- Camargo-de-Morais M.M., Maia M.M.D., Borba F.F.S., Melo K.G., Santos C.M.S.O., Reis E.R.A., Morais Jr. M.A., Lima-Filho J.L. 2003. Oil/mineral-salts medium designed for easy recovery of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* AM3. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 19: 17-20.
- Candau R., Avalos J., Cerda-Olmedo E. 1991. Gibberellins and carotenoids in the wild type and mutants of *Gibberella fujikuroi*. Applied and Environment Microbiology. 57 (11): 3378-3382.

Cane E.D. 1994. Polyketide biosynthesis: molecular recognition or genetic programming? *Science*. 263: 338-340.

Castaño T.E. Domínguez D.J. 2001. Diseño de experimentos para el desarrollo tecnológico y mejora industrial. Just in Time Press. México.

Chávez-Parga, M.C., González-Ortega, O., Negrete-Rodríguez, M.L.X., Medina-Torres, L. y E.M. Escamilla-Silva. (2007). Hydrodynamics, mass transfer and rheological studies of gibberellic acid production in an airlift bioreactor. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 23, 615-623.

Chávez-Parga, M.C. (2005). Tesis de Doctorado en Ciencia en Ingeniería Química. Producción de ácido giberélico en un biorreactor airlift. Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato. México.

Demain A.L. 1974. How do antibiotic-producing microorganisms avoid suicide? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235: 601.

Demain A.L. 1991. Regulation of secondary metabolism. In: *Biotechnology of filamentous fungi – Technology and products*. Edited by: D.B. Finkelstein and C. Ball. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 8-112.

Diniz Maia M.M., Camargo de Morais M.M., De Morais M.A., Magalhães Melo E.H., De Lima Filho J.L. 1999. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. *Revista de Microbiología*. 30: 304-309.

Drew S.W. and Demain A.L. 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 343-356.

Durán-Páramo E., Molina-Jiménez H., Brito-Arias M. A., Robles-Martínez F. 2004. Gibberellic acid production by free and immobilized cells in different culture systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 113, 116: 381-388.

Escamilla E.M., Dendooven L., Uscanga-Reynell J.A., Monroy-Ramírez A.I., González-Alatorre G., De la Torre M. 1999. Morphological development and gibberellin production by different strains of *Gibberella fujikuroi* in shake flasks and bioreactor. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 15: 753-755.

Escamilla E.M., Dendooven L., Magaña I.P., Parra R., De la Torre M. 2000. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors. *J. Biotechnology*. 76: 147-155.

Ertola, R., Mignone C., Yantorno, O. 1995. *Microbiología Industrial. Monografías del Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Departamento de Asuntos Científicos y Tecnológicos de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA)*.

Ferrer M., Plou F.J., Nuero O.M., Reyes F., Ballesteros A. 2000. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. J. Chem. Technol. Biotechnol. 75: 569-576.

Flores-Cano J.V. 2008. Tesis de maestría: Efecto del enriquecimiento del flujo de gas de alimentación con O<sub>2</sub> sobre la producción de GA<sub>3</sub> empleando *Gibberella fujikuroi*. Instituto Tecnológico de Celaya.

Folch J., Less M, Sloane-Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry. 226: 497-509.

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.

Gancheva V., Dimova T., Kamenov K., Foutekova M. 1984. Biosynthesis of gibberellins III. Optimization of nutrient medium for biosynthesis of gibberellins upon using mathematical methods for planning the experiments. Acta Microbiol Bulgarica. 14: 80-84.

Giordano W., Domenech C.E. 1999. Aeration affects acetate destination in *Gibberella fujikuroi*. FEMS Microbiology Letters. 180: 111-116.

Giordano W., Avalos J., Cerdá-Olmedo E., Doménech C.E. 1999. Nitrogen availability and production of bikaverin and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. FEMS Microbiology Letters. 173: 389-393.

Hamilton J.A. 1998. Fatty acid transport: difficult or easy? J. Lipid Research. 39: 467-481.

Hedden P., Kamiya Y. 1997. Gibberellin biosynthesis: Enzymes, genes and their regulation. Annual Review Plant Physiology. 48: 431-460.

Holbrook, A. A., Edge, W. J. W., Bailey, F. 1961. Spectrophotometric Method for Determination of Gibberellic Acid. Advances in Chemistry Series. 159-167.

Hollman D., Switalski J., Geipel S., Onken U. 1995. Extractive fermentation of gibberellic acid by *Gibberella fujikuroi*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 79: 594-600.

Horinouchi S. and Beppu T. 1992. Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. Annu. Rev. Microbiol. 46: 377-398.

Hoshino T., Sasaki T., Watanabe, Yuichi W., Nagasawa T., Yamane T. 1992. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Biosc. Biotechnol. Biochem. 56: 660-664.

Jacklin A., Ratledge C., Wynn J.P. 2000. Lipid-to-gibberellin metabolic switching in *Fusarium moniliforme* via the action of sesamol. *Biotechnology Letters*. 22(24): 1983-1986.

Jefferys E.G. 1970. The Gibberellin Fermentation. *Advances in Applied Microbiology*. 13: 283-316.

Jennings J.C., Coolbaugh R.C., Nakata D.A., Est C.A. 1993. Characterization and solubilization of kaurenoic acid hydroxylase from *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiol*. 101: 925-930.

Juarez C., Rochín L.C. 1966. *Manual de Química Aplicada*. Imprenta Arana, S.A.

Karakoc S. and Aksöz N. 2006. Some optimal cultural parameters for gibberellic acid biosynthesis by *Pseudomonas* sp. *Turk J. Biol*. 30: 81-85.

Kawanabe Y., Yamane H., Murayama T., Takahashi N., Nakamura T. 1983. Identification of gibberellin A<sub>3</sub> in mycelia of *Neurospora crassa*. *Agric. Biol. Chem*. 47: 1693-1694.

Knight K., Barros Pimentel M. C., Camargo de Moraes M.M., Ledingham W.M., De Lima Filho J.L., Diniz Maia M.M. 2000. Immobilization of lipase from *Fusarium solani* FS1. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31: 220-222.

Kuhr I. 1962. Decomposition of gibberellic acid in aqueous solutions. *Folia Microbiologica*. 358-363.

Kumar P.K.R., Lonsane B.K. 1989. Microbial production of gibberellins: state of the art. *Advanced Applied Microbiology*. 34: 29-139.

Kumar P.K.R., Lonsane B.K. 1990. Solid state fermentation: physical and nutritional factors influencing gibberellic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 34: 145-148.

Lee J.M. 1992. *Biochemical Engineering*. Ed. Prentice Hall. United States of America.

Linnemannstönns P., Voß T., Hedden P., Gaskin P., Tudzynski B. 1999. Deletions in the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi* by restriction enzyme-mediated integration and conventional transformation-mediated mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol*. 65(6): 2558-2564.

MacMillan J. 1997. Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. *Nat. Prod. Rep*. 1: 221-243.

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: 495-507.

Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31: 426-428.

Monteiro-Machado C.M., Oishi B.O., Pandey A., Soccol C.R. 2004. Kinetics of *Gibberella fujikuroi* growth and gibberellic acid production by solid-state fermentation in a packed-bed column bioreactor. Biotechnology Progress. 20: 1449-1453.

Monteiro-Machado C.M. and Soccol C.R. 2007. Gibberellic Acid Production. Chapter 13. In: Current Developments in Solid-State Fermentation. Edited by: A. Pandey, C.R. Soccol and C. Larroche. pp. 277-301.

Muromtsev G.S., Agnistova V.N. 1984. Gibberellins. Ed. Letunova S.V. Nauka, Moscow.

Nakanishi K. 1974. Diterpenes. Chapter 4. Volume 1. In: Natural Products Chemistry. Edited by: K. Nakanishi. Academic Press, Inc, New York. pp. 265-274.

Negrete-Rodríguez X. 2002. Tesis de maestría: Producción de ácido giberélico en biorreactor de tanque agitado con *Gibberella fujikuroi* empleando aceite de maíz como fuente de carbono. Instituto Tecnológico de Celaya.

Negrete-Rodríguez X. 2007. Tesis de doctorado: Producción de giberelinas por *G. fujikuroi*: Efecto de las condiciones de agitación y aireación en la productividad de un cultivo tetrafásico micelar. Instituto Tecnológico de Celaya.

Oller-López J.L., Avalos J., Barrero A.F., Oltra J.E. 2003. Improved GA<sub>1</sub> production by *Fusarium fujikuroi*. Applied Microbiology and Biotechnology. 63: 282-285.

Pape H. and Rehm H.J. 1986. Microbial products II. Volume 4. In: Biotechnology. Edited by: H.J. Rehm and G. Reed. pp. 621.

Patiño V.M. 1995. Tesis de Maestría en Biotecnología: Establecimiento de un proceso de fermentación sumergida para la producción de ácido giberélico a nivel laboratorio y su escalamiento a planta piloto. Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos.

Phinney B.O. 1983. The history of gibberellins. In: Crozier A (ed) The biochemistry and physiology of gibberellins. Vol 1. Praeger, New York. pp. 19-52.

Presley, B.J. 1971. Appendix: Techniques for Analyzing Interstitial Water Samples. Part I: Determination of Selected Minor and Major Inorganic Constituents. In Winterer et al. Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project. Volume VII. Washington, U.S. Government Printing Office, pp. 1749-1755.

Rademacher W. 1994. Gibberellin formation in microorganisms. Plant Growth Regulation. 15: 303-314.

Radley M. 1956. Occurrences of substances similar to gibberellic acid in higher plants. Nature. 178: 1070-1071.

- Rademacher W., Graebe J.E. 1979. Gibberellin A<sub>4</sub> produced by *Sphaceloma manihoticola*, the cause of the superelongation disease of cassava (*Manihot esculenta*). Biochem. Biophys. Res. Commun. 91: 35-40.
- Rapp P. 1995. Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Enz. Microbiol. Technol. 17: 832-838.
- Raventos D., Meier C., Mattsson O., Jensen A.B., Mundy J. 2000. Fusion genetic analysis of gibberellin signaling mutants. The Plant Journal. 22 (5): 427-438.
- Rehm H.J. and Reed G. 1981. Microbial fundamentals. Volume 1. In: Biotechnology. Edited by: H.J. Rehm and G. Reed. pp. 269-274.
- Rios-Irribé E.Y. 2003. Tesis de maestría: Expresión genética del hongo *Gibberella fujikuroi* bajo dos diferentes fuentes de carbono mediante la técnica de despliegue diferencial. Universidad Autónoma de Querétaro-Instituto Tecnológico de Celaya.
- Robinson T., Singh D., Nigam P. 2001. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. Appl Microbiol Biotechnol. 55: 284-289.
- Rojas M.C., Hedden P., Gaskin P., Tudzynski B. 2001. The *P450-1* gene of *Gibberella fujikuroi* encodes a multifunctional enzyme in gibberellin biosynthesis. Microbiology. 98(10): 5838-5843.
- Rols J.L., Condoret J.S., Fonade C., Goma G. 1990. Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen-vectors. Biotechnology and Bioengineering. 35: 427-435.
- Rols J.L., Goma G. 1991. Enhanced oxygen transfer rates in fermentation using soybean oil-in-water dispersions. Biotechnology Letters. 13 (1): 7-12.
- Rybakov Y.A. and Bourd G.I. 1991. Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis enzyme complex in *Fusarium moniliforme*. Journal of Biotechnology. 21: 219-228.
- Sánchez-Fernández R., Avalos J., Cerdá-Olmedo E. 1997. Inhibition of gibberellin biosynthesis by nitrate in *Gibberella fujikuroi*. FEBS Letters. 413: 35-39.
- Sassa T., Kawaide H., Takarada T. 1994. Identification of gibberellins A<sub>4</sub>, A<sub>9</sub>, and A<sub>24</sub> from *Phaeosphaeria* sp. L487 cultured in a chemically defined medium. Biosci. Biotech. Biochem. 58(2): 438-439.
- Shukla R., Srivastava A.K., Chand S. 2003. Bioprocess strategies and recovery process in gibberellic acid fermentation. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 8: 269-278.
- Shukla R., Chand S., Srivastava A.K. 2005a. Batch kinetics and modeling of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*. Enzyme and Microbial Technology. 36: 492-497.

- Shukla R., Chand S., Srivastava A.K. 2005b. Improvement of gibberellic acid production using a model based fed-batch cultivation of *Gibberella fujikuroi*. *Process Biochemistry*. 40: 2045-2050.
- Shye-Jye T., Kuang-Hui S., Guang-Huan S., Terng-Yuan C., Guan-chiun L. 2000. Recombinant expression of the *Candida rugosa lip4* lipase in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 20: 308-313.
- Solorza-Salas, F. 1999. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química: Mejoramiento de los parámetros para la obtención de ácido giberélico en un biorreactor mecánicamente agitado utilizando al hongo *Gibberella fujikuroi*: Facultad de Química. Universidad de Guanajuato.
- Solórzano, L. 1969. Determination of Ammonia in Natural Waters by the Phenolhypochlorite Method. *Limnol. Oceanogr.* 14: 799-801.
- Spizek J. and Tichy P. 1995. Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Folia Microbiol* 40: 43-50
- Sun T.P., Kamiya Y. 1997. Regulation and cellular localization of *ent*-kaurene synthesis. *Plant Physiol*. 101: 702-708.
- Sunder, S. and Satyavir. 1998. Vegetative compatibility, biosynthesis of GA<sub>3</sub> and virulence of *Fusarium moniliforme* isolates from bakanae disease of rice. *Plant Biology*. 47: 767-772.
- Tudzynski B., Hölter K. 1998. Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal Genet. Biol.* 25: 157-170.
- Tudzynski B. 1999. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 298-310.
- Tudzynski B. 2005. Gibberellin biosíntesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66: 597-611.
- Uscanga-Reynell, J.A. 1992. Tesis de Licenciatura Químico Bacteriólogo y Parasitólogo: Optimización de inóculos de *Gibberella fujikuroi* para la producción de ácido giberélico y descripción morfológica de la cepa durante el proceso de fermentación. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D.F.
- Vass R.C. and Jefferys E.G. 1979. Gibberellic acid. Chapter 9. In: *Economic microbiology*. Volume 3. Edited by: A.H. Rose. Academic Press London.
- Vining L.C. 1992. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity – a review. *Gene*. 115: 135-140.
- Wang D.I.C., Cooney C.L., Demain A.L., Dunnill P., Humphrey A.E., Lilly M.D. 1979. *Fermentation and enzyme technology*. A wiley-Interscience Publication. pp. 6-8.

West C. and Phinney B. 1956. Gibberellins as native plant growth regulators. Annual review of plants physiology. 11: 411-436.

Woitek S., Unkles S.E., Kinghorn J.R., Tudzynski B. 1997. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene of *Gibberella fujikuroi*: isolation and characterization. Curr. Genet. 31: 38-47.

Yabuta T. and Sumiki T. 1938. Communication to the editor. J. Agric. Chem. Soc. Japan. 14: 1526.

Yabuta, T. 1935. Biochemistry of the "bakanae" fungus of rice. Ag. Hort. 10: 17-22.

## **APÉNDICE A: Preparación de reactivos**

A continuación se detalla como preparar los reactivos indispensables para la cuantificación de los sustratos presentes en el medio de cultivo a cada tiempo de muestreo.

### **Determinación de glucosa**

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

Solución madre de glucosa a  $1 \text{ mg mL}^{-1}$

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

Reactivo de Miller

10 g de hidróxido de sodio

2 g de fenol

0.5 g de sulfito de sodio

10 g de ácido dinitrosalicílico

Se disolvió el NaOH 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

40 g de tartrato de sodio y potasio

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

### **Cuantificación de fosfatos**

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

Solución madre de fosfato a  $500 \text{ mg L}^{-1}$

0.7165 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Disolver en agua destilada el fosfato de potasio monobásico, previamente secado en estufa a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 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 el molibdato de amonio en 200 mL de agua destilada. Agregar cuidadosamente el ácido sulfúrico concentrado en 400 mL de agua; dejar enfriar la solución y agregar el ácido nítrico; finalmente, agregar la solución de molibdato de amonio y aforar a 1 L con agua destilada.

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 anhidro

Disolver las sales en 900 mL de agua destilada y en esta mezcla disolver el ácido sulfónico finamente triturado; finalmente se diluye a 1 L. Guardar en frasco ámbar de tapón esmerilado a una temperatura que no exceda los 30 °C. La solución es estable durante 4 meses.

### **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 secado en estufa a 105 °C; la disolución 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 nitroprusido de sodio ( $\text{C}_5\text{FeN}_6\text{Na}_2\text{O}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 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

Esta solución oxidante se preparó disolviendo 4 mL de hipoclorito de sodio al 10% y aforando a 100 mL con la solución alcalina C. Se debe preparar justo antes de usar.

### **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 1.1513 g de glicerol y aforar a 1 L.

### Metaperyodato de Sodio

77 g acetato de amonio anhidro  
60 mL de ácido acético glacial  
650 mg de metaperyodato de sodio

Disolver el acetato de amonio anhidro en alrededor de 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 de laboratorio.

## Acetilacetona

0.75 mL de acetilacetona

19.25 mL de isopropanol

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.

## APÉNDICE B: Curvas 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 reproducibilidad en la preparación de los reactivos y al uso del mismo equipo de medición.

### Determinación de glucosa

Cuadro 12. Datos para la realización de la curva de calibración para determinar glucosa

$\text{mg mL}^{-1}$	$A_{\lambda=575\text{nm}}$
0.1	0.1093
0.2	0.2061
0.4	0.4521
0.6	0.6784
0.8	0.9155
1	1.1297

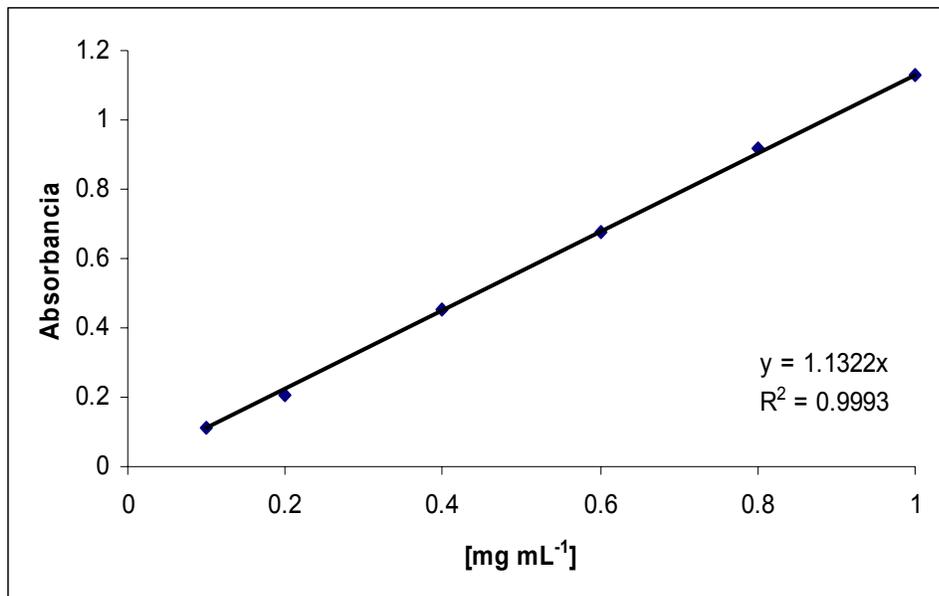


Figura 22. Curva de calibración para cuantificar el sustrato glucosa.

## 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	0.1846
10	0.3674
15	0.5469
20	0.7316
25	0.9063

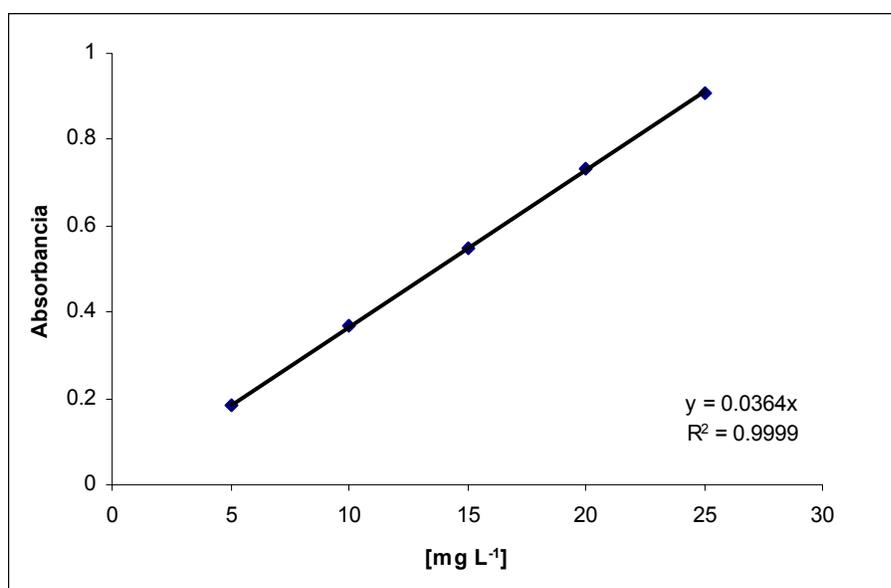


Figura 23. Curva de calibración utilizada para determinar fosfatos.

## Determinación de nitrógeno amoniacal

Cuadro 14. Datos para la construcción de la curva de calibración para determinar nitrógeno amoniacal

$\text{mg N}_2 \text{ L}^{-1}$	$A_{\lambda=660\text{nm}}$
0.3500	0.0605
0.7000	0.1383
1.4000	0.2572
2.1000	0.3920
3.5000	0.6628
4.2000	0.8291
5.6000	1.0923
7.0000	1.3232

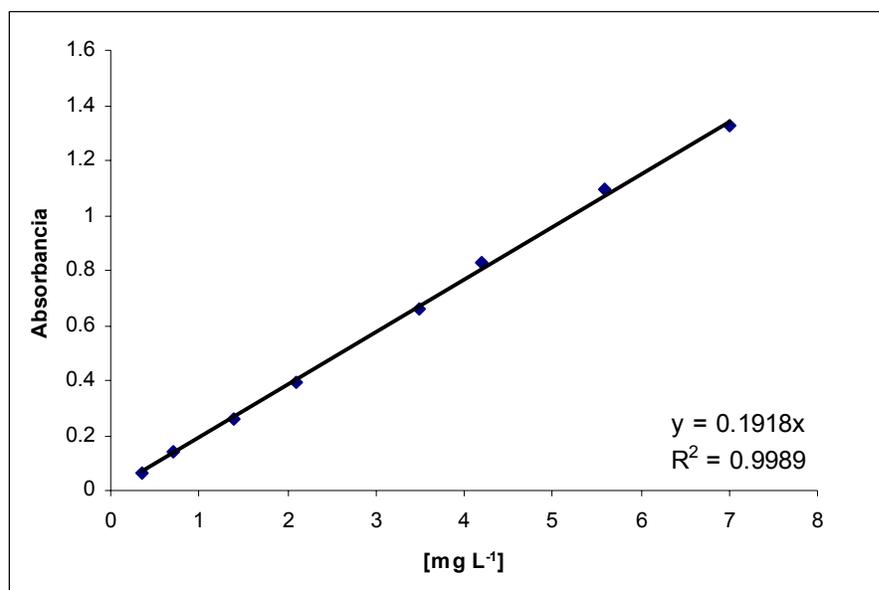


Figura 24. Curva de calibración empleada para la determinación de nitrógeno.

## Determinación de glicerol

Cuadro 15. Datos para la realización de la curva de calibración para determinar glicerol

$\text{mmol L}^{-1}$	$A_{\lambda=414\text{nm}}$
3.2	1.8702
1.6	0.6668
0.8	0.2141
0.4	0.0681
0.2	0.0342
0.1	0.0159

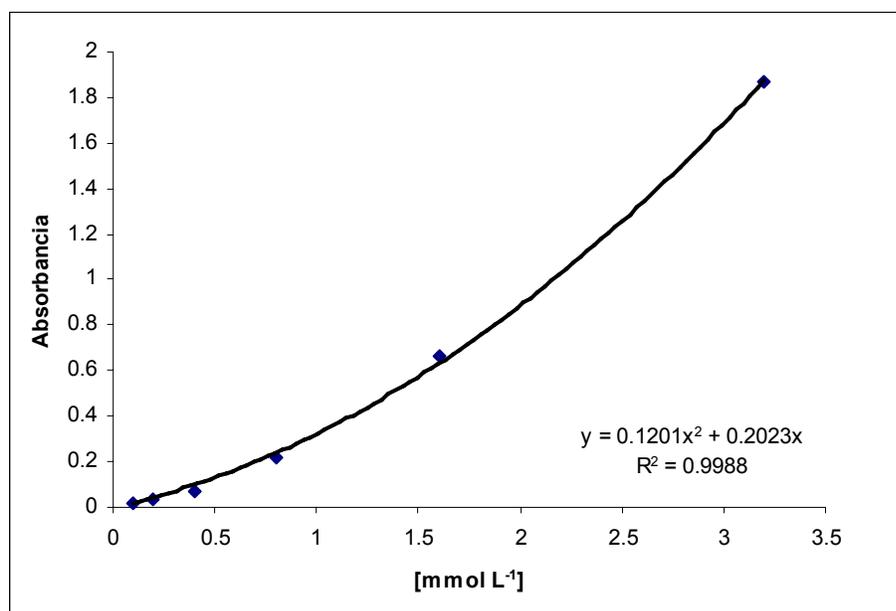


Figura 25. Curva de calibración para cuantificar glicerol.

## Cuantificación de ácido giberélico

A continuación se muestran los datos obtenidos para preparar la curva de calibración mediante HPLC, así como, los cromatogramas resultantes al analizar distintas concentraciones de ácido giberélico.

Cuadro 16. Datos obtenidos por HPLC para la construcción de la curva de calibración para GA<sub>3</sub>.

mg L <sup>-1</sup>	Área
1000	19261970
800	16178138
500	10634466
200	4618220
50	1145000

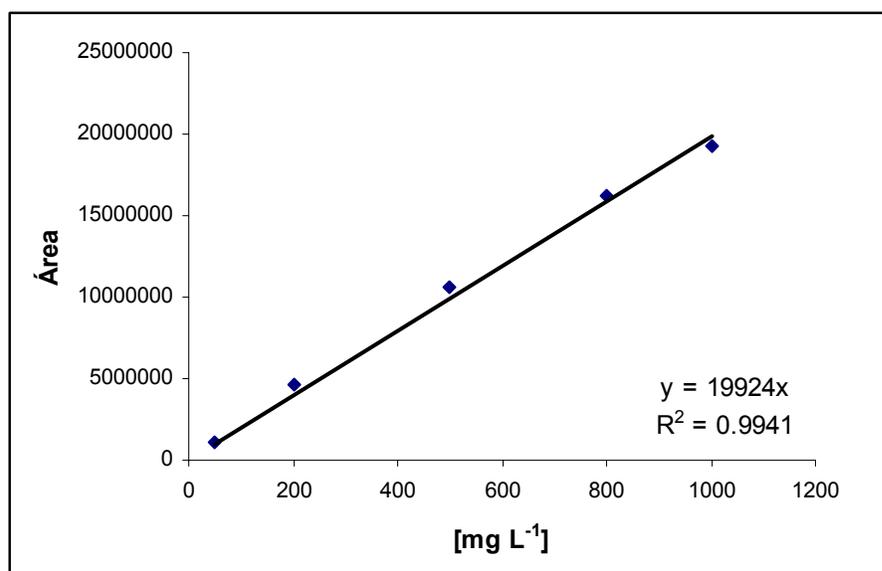


Figura 26. Curva de calibración para la determinación de GA<sub>3</sub>.

**Cromatogramas obtenidos por análisis de HPLC a concentraciones conocidas de GA<sub>3</sub> para la curva de calibración**

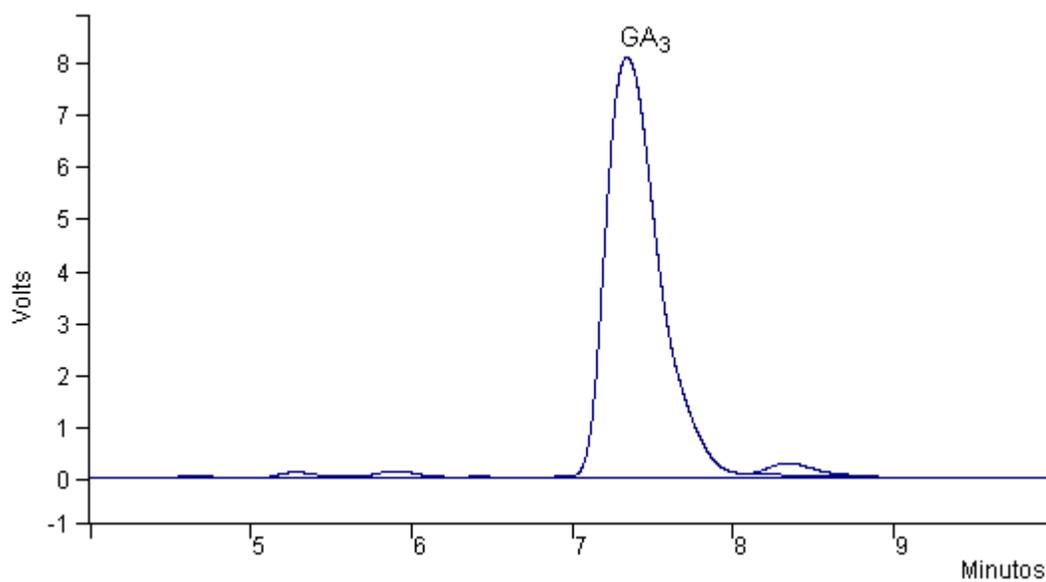


Figura 27. Cromatograma de ácido giberélico a 1000 ppm.

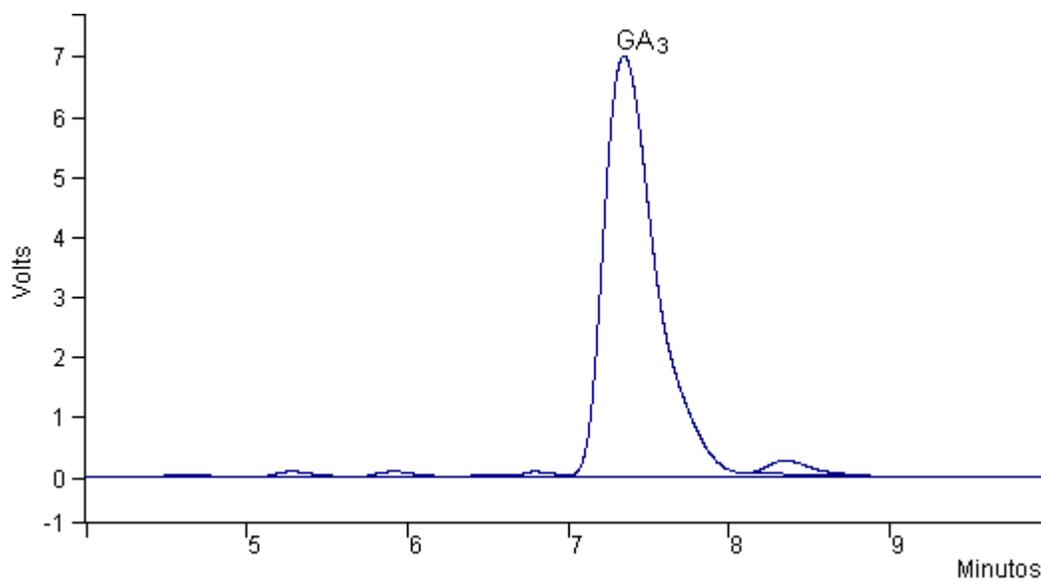


Figura 28. Cromatograma de ácido giberélico a 800 ppm.

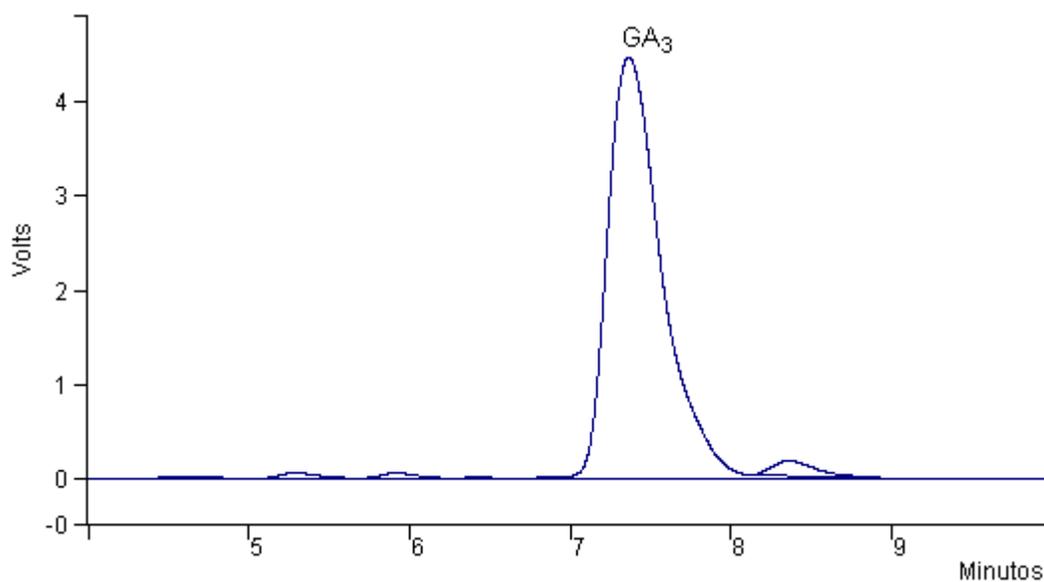


Figura 29. Cromatograma de ácido giberélico a 500 ppm.

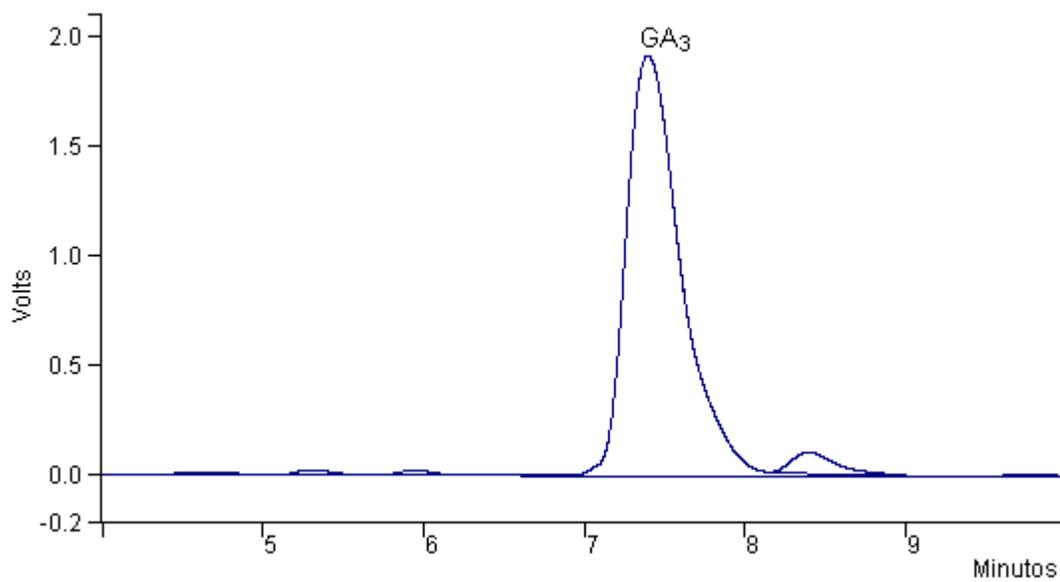


Figura 30. Cromatograma de ácido giberélico a 200 ppm.

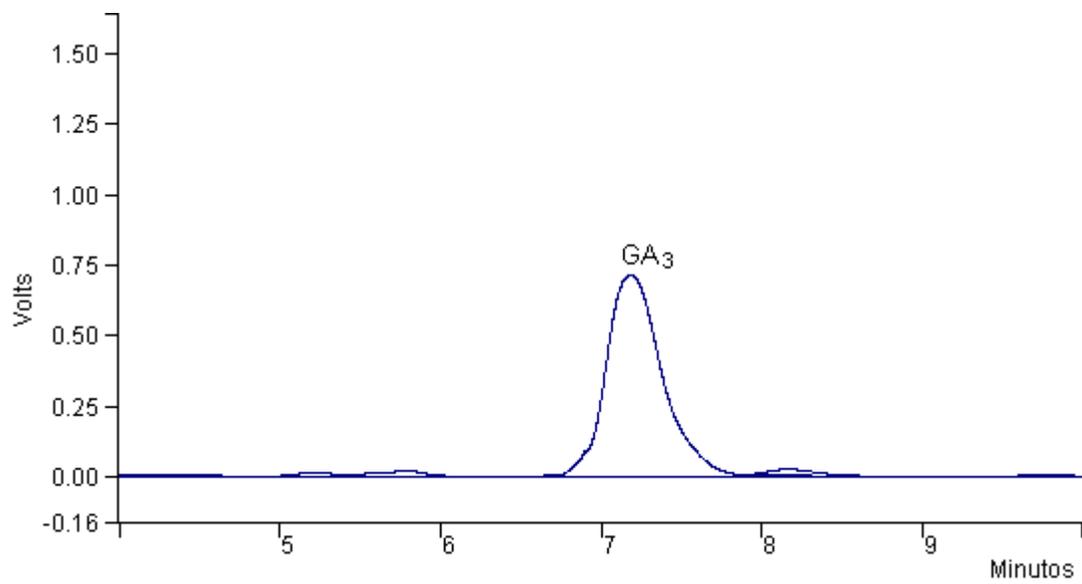


Figura 31. Cromatograma de ácido giberélico a 50 ppm.

## Cuantificación de ácidos grasos

Se realizó la curva de calibración para cada ácido graso mediante el análisis por cromatografía de gases de mezclas a diferentes concentraciones de los principales ácidos grasos. A continuación se muestran las concentraciones de cada mezcla de ácidos realizada y sus respectivos cromatogramas.

Cuadro 17. Mezclas de ácidos grasos analizadas por CG para realizar las curvas de calibración.

<b>Mezcla de ácidos [ppm]</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Ácido palmítico	3000	1500	750	375	187.5
Ácido esteárico	2000	1000	500	250	125
Ácido oleico	3848	1924	962	481	240.5
Ácido linoleico	3256	1628	814	407	203.5

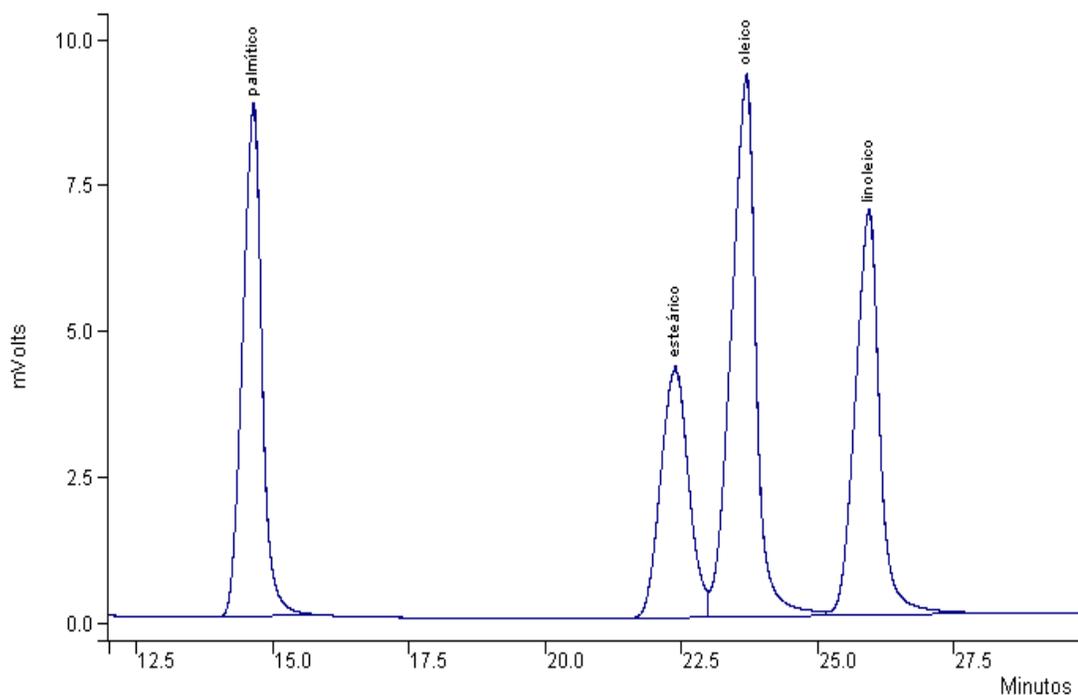


Figura 32. Cromatograma de la mezcla de ácidos grasos uno

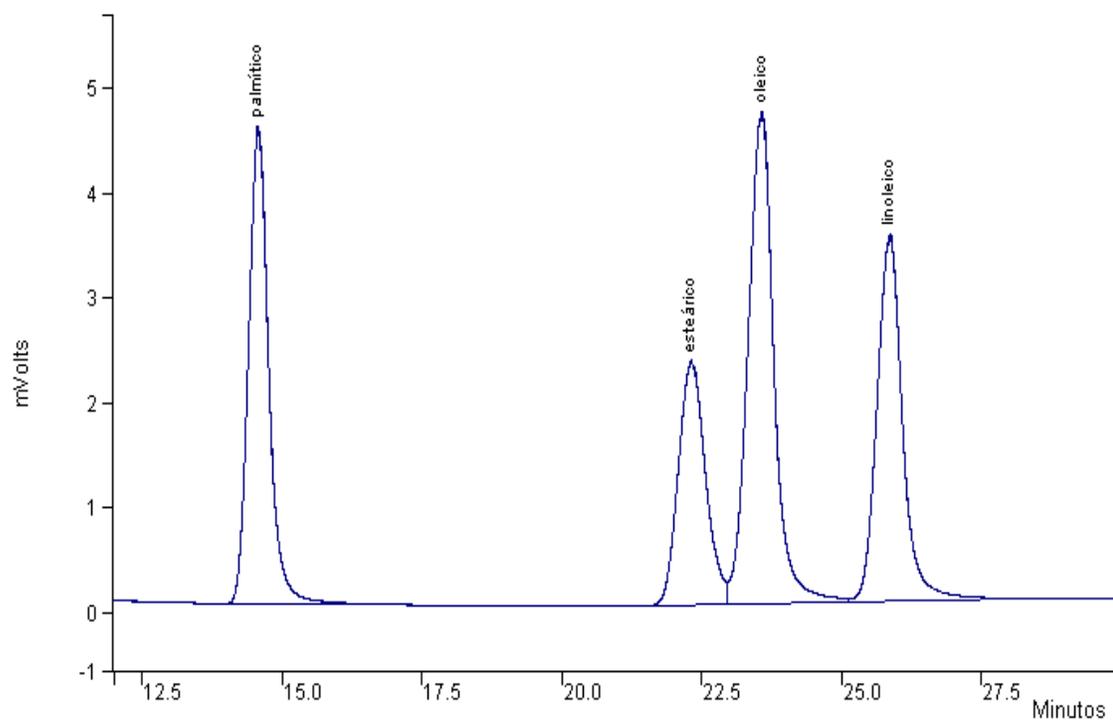


Figura 33. Cromatograma de la mezcla de ácidos grasos dos

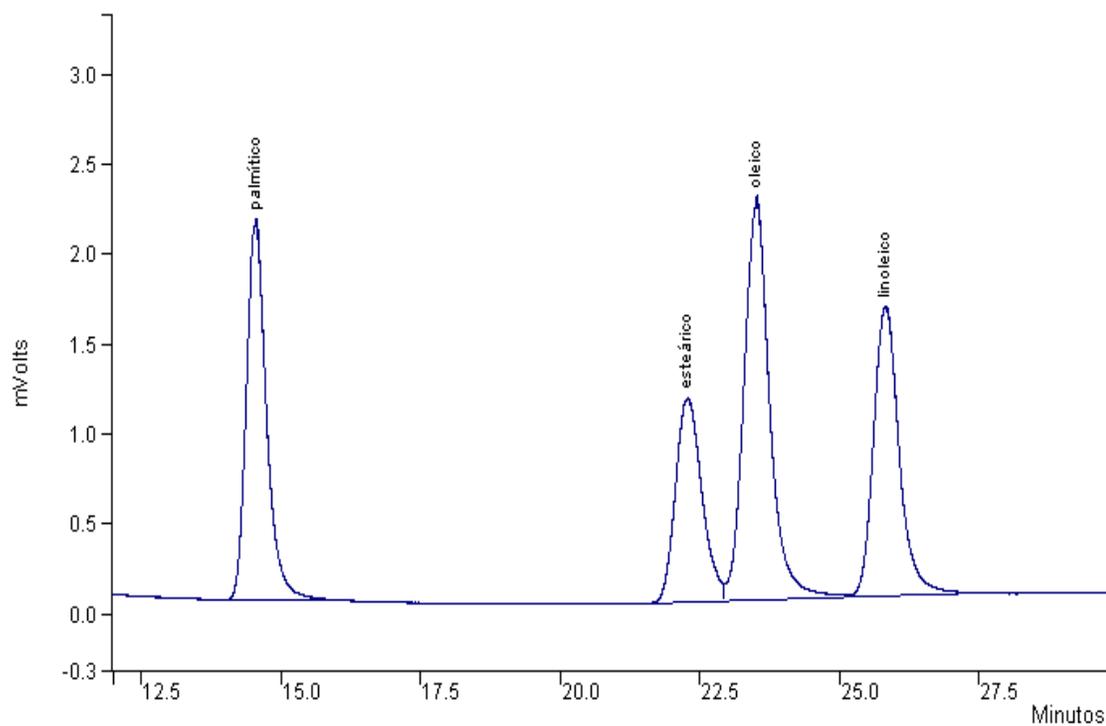


Figura 34. Cromatograma de la mezcla de ácidos grasos tres.

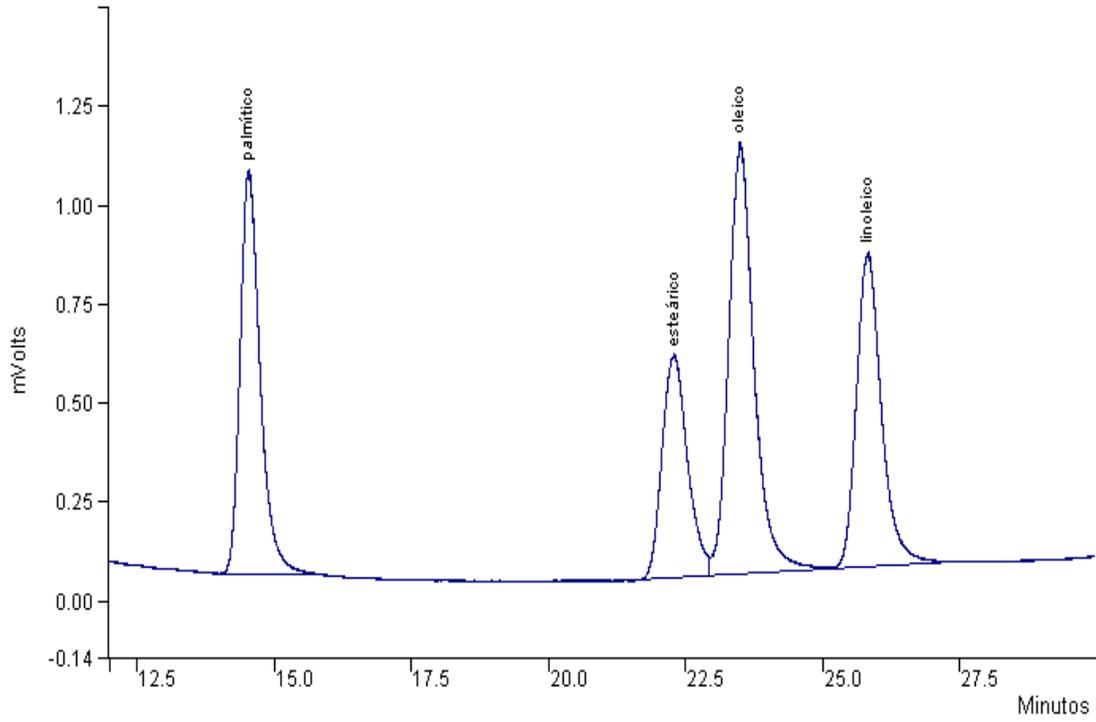


Figura 35. Cromatograma de la mezcla de ácidos grasos cuatro

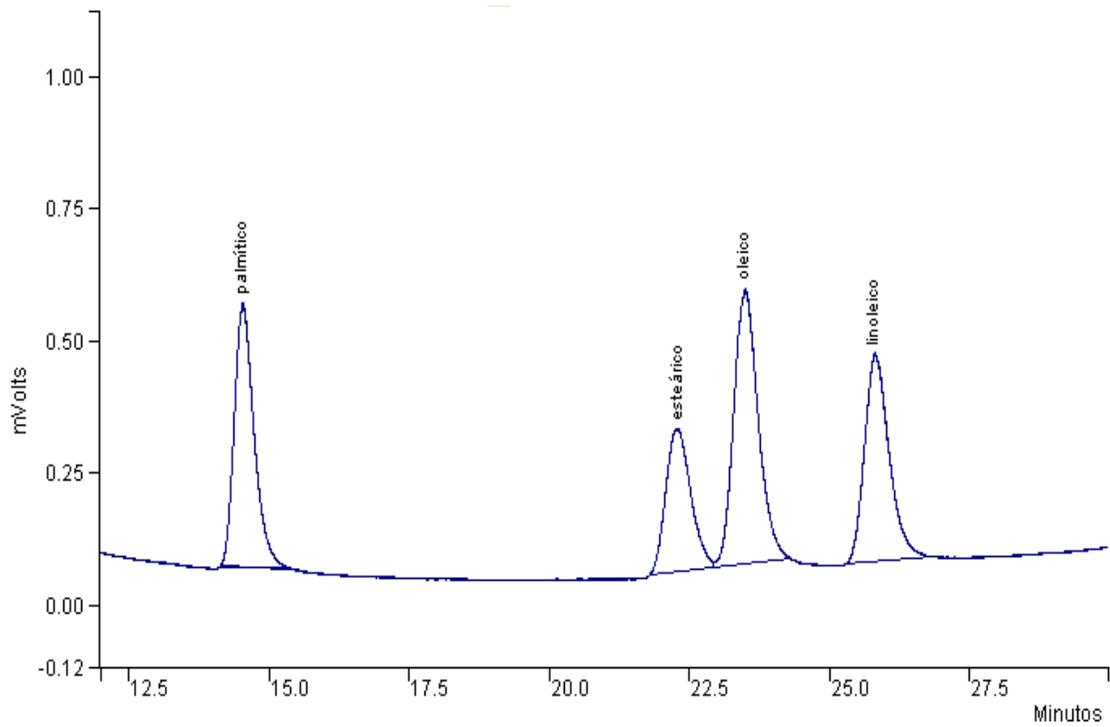


Figura 36. Cromatograma de la mezcla de ácidos grasos cinco.

## Curva de calibración del ácido palmítico

Las concentraciones y las áreas registradas en los cromatogramas para realizar la curva de calibración del ácido palmítico son las siguientes:

Cuadro 18. Datos para la curva de calibración del ácido palmítico

[ppm]	Área
3000	217998
1500	113662
750	53156
375	25895
187.5	11390

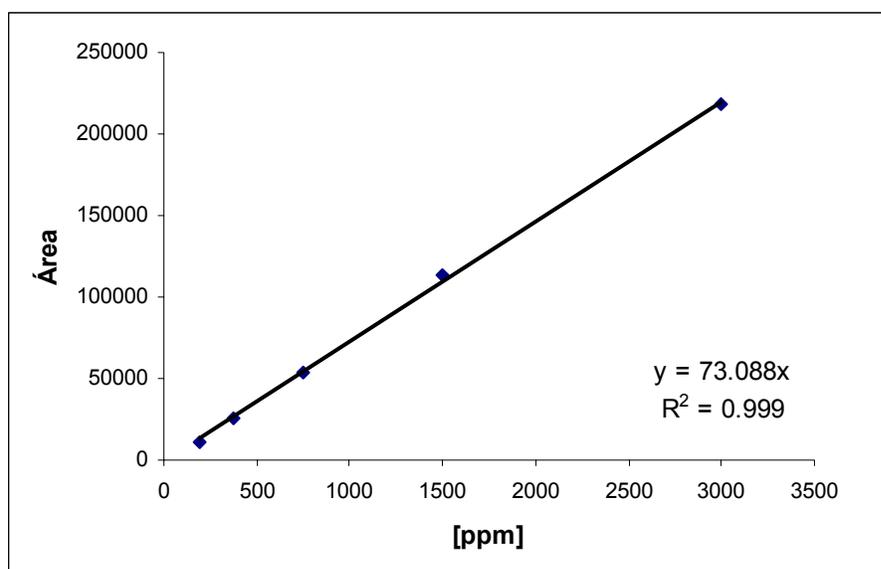


Figura 37. Curva de calibración para ácido palmítico.

## Curva de calibración para el ácido esteárico

Cuadro 19. Datos para la curva de calibración del ácido esteárico

[ppm]	Área
2000	153679
1000	78658
500	37441
250	18374
125	8351

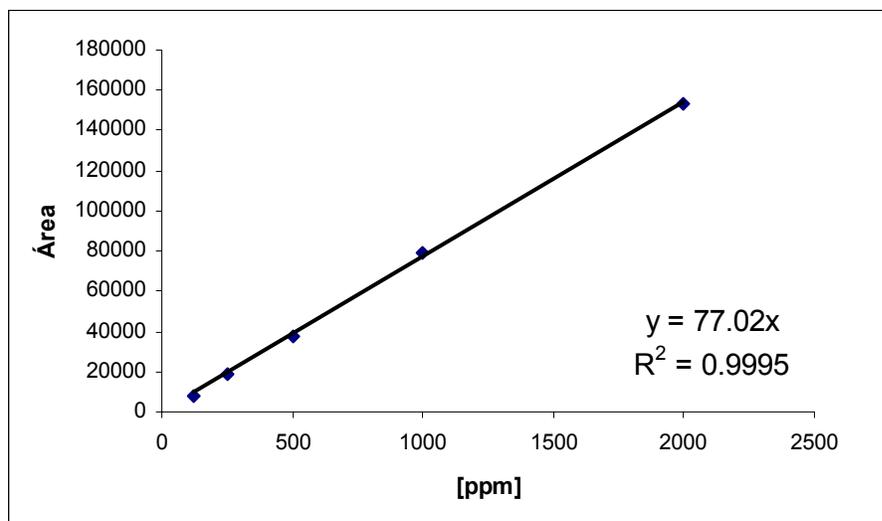


Figura 38. Curva de calibración para ácido esteárico.

## Curva de calibración para el ácido oleico

Cuadro 20. Datos para la curva de calibración del ácido oleico

[ppm]	Área
3848	294423
1924	151535
962	71587
481	35302
240.5	15782

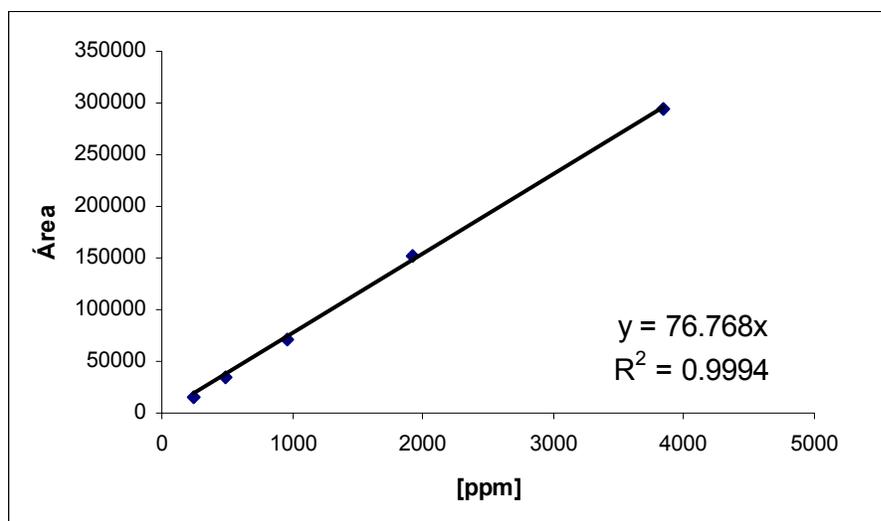


Figura 39. Curva de calibración para cuantificar ácido oleico.

## Cuantificación de ácido linoleico

Cuadro 21. Datos para la curva de calibración del ácido linoleico

[ppm]	Área
3256	216589
1628	111646
814	51948
407	25400
203.5	12123

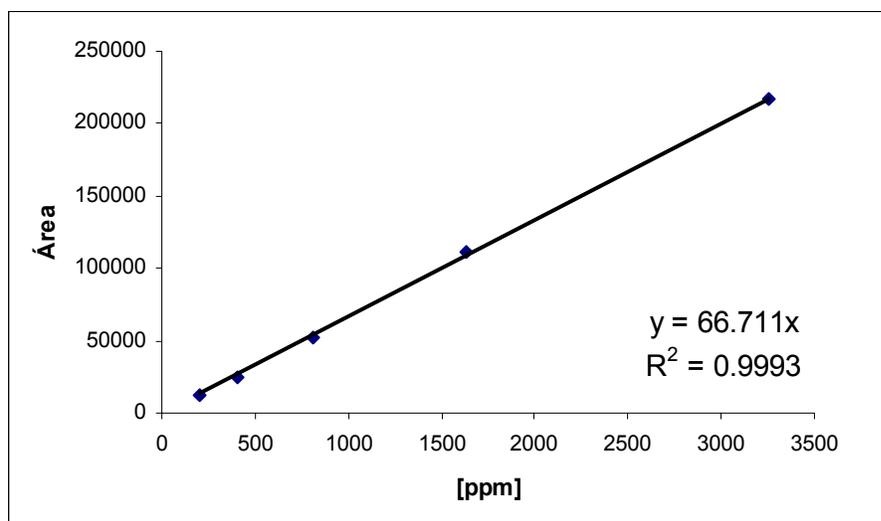


Figura 40. Curva de calibración para cuantificar ácido linoleico.

## APÉNDICE C: Análisis estadístico

El análisis estadístico es de suma importancia para dar soporte a las conclusiones. El análisis de varianza (ANDEVA), se utiliza para analizar las diferencias entre tratamientos, esto es, encontrar o no efectos significativos entre los niveles de un factor. En el ANDEVA, se emplea un par de hipótesis, la hipótesis nula,  $H_0$ , es decir, que la media de cada nivel son iguales y por lo tanto, no hay efectos significativos entre niveles; y la hipótesis alternativa,  $H_1$ , que consiste en suponer que al menos una media de los niveles del factor es diferente a las demás y por consiguiente se tiene un efecto significativo entre los tratamientos. El criterio de validación de las hipótesis propuestas es la comparación de la variable aleatoria  $F_C$  (cociente que compara la variabilidad aportada por las diferencias entre tratamientos, con la variabilidad aportada por el error experimental) con el valor de la distribución F encontrada en tablas para  $(k-1)$  y  $\sum_{i=1}^k (n_i - 1)$  grados de libertad respectivamente, y  $\alpha=0.05$ . Si  $F_C$  es mayor que F, se rechaza  $H_0$ , por tanto, podemos aceptar que existe diferencia significativa en al menos uno de los tratamientos analizados. Con este análisis se puede detectar estadísticamente diferencias globales.

### Análisis de Varianza (ANDEVA)

El análisis de varianza, realizado a los datos de concentración máxima de  $GA_3$ , para las proporciones de fuente de carbono mixta usadas en esta investigación mostró que  $F_C > F$  para un nivel de confianza de 95%, (valor  $p=0.008394$ ), por lo que estadísticamente, al menos uno de los tratamientos presenta una producción de  $GA_3$  diferente. Los resultados de dicho análisis se muestran en forma resumida en el cuadro 6. Se utilizó el software Statistica Ver. 5.5.

## Prueba de Tukey

La prueba de Tukey se basa en comparar los niveles del factor por pares, y las diferencias de media para cada par comparativo; se utiliza el estadístico  $T$  propuesto por Tukey-Kramer para construir el intervalo de confianza:  $\bar{y}_{i\cdot} - \bar{y}_{j\cdot} - T < \mu_i - \mu_j < \bar{y}_{i\cdot} - \bar{y}_{j\cdot} + T$ . Si el intervalo de confianza de cada par contiene el valor cero, se infiere que todas las medias de los tratamientos son iguales estadísticamente, si cualquiera de los intervalos no incluye el valor cero, entonces, las medias correspondientes son diferentes estadísticamente.

## Prueba de Dunnett

La prueba de Dunnett se utiliza en muchos experimentos donde el interés es comparar con la respuesta media  $\mu_0$  de un tratamiento control. Se realizan diferencias de medias entre cada uno de los tratamientos del plan experimental con el (los) tratamiento (s) de control. Al igual que en la prueba de Tukey, se obtiene el valor de un estadístico, en este caso  $D$ , para realizar los intervalos de confianza:  $\bar{y}_{i\cdot} - \bar{y}_{j\cdot} - D < \mu_i - \mu_j < \bar{y}_{i\cdot} - \bar{y}_{j\cdot} + D$ . Y de igual manera, si el intervalo de confianza contiene el valor cero, no hay diferencia significativa entre los dos tratamientos, pero si el intervalo de confianza no incluye el valor cero existe diferencia significativa para el nivel de significancia propuesto ( $\alpha=0.05$ ).

## **APÉNDICE D: Artículo aceptado para publicación**

Rios-Irube E.Y., Flores-Cotera L.B., González-Chavira M.M., González-Alatorre G., Escamilla-Silva E.M. Accepted October 2010. Inductive effect produced by a mixture of carbon source in the production of gibberellic acid by *Gibberella fujikuroi*. World J Microbiol Biotechnol.

# Inductive effect produced by a mixture of carbon source in the production of gibberellic acid by *Gibberella fujikuroi*

Erika Y. Rios-Iribe · Luis B. Flores-Cotera ·  
Mario M. González Chávira · Guillermo González-Alatorre ·  
Eleazar M. Escamilla-Silva

Received: 8 August 2009 / Accepted: 27 October 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** Gibberellic acid has been known since 1954 but its effect on rice still remains very important in the agricultural world. Gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) is the main secondary metabolite produced by the *Gibberella fujikuroi* fungus. This hormone is of great importance in agriculture and the brewing industry, due to its fast and strong effects at low concentrations (μg) on the processes of growth stimulation, flowering, stem elongation, and germination of seeds, among others. Plant promoters of growth production such as the gibberellins, especially the GA<sub>3</sub> are a priority in obtaining better harvests in the agricultural area and by extension, improving the food industry. Three routes to obtaining GA<sub>3</sub> have been reported: extraction from plants, chemical synthesis and microbial fermentation. The latter being the most common method used to produce GA<sub>3</sub>.

In this investigation, glucose-corn oil mixture was used as a carbon source on the basis of 40 g of carbon in a 7 L stirred tank bioreactor. A pH of 3.5, 29°C, 600 min<sup>-1</sup> agitation and 1 vvm aeration were maintained and controlled with a biocontroller connected to the bioreactor, throughout the entire culture time. The carbon source mixture affected the fermentation time as well as the production of the GAs. The production of 380 mg GA<sub>3</sub>L<sup>-1</sup> after 288 h of fermentation was obtained when the glucose-corn oil mixture was employed contrasting the 136 mg GA<sub>3</sub>L<sup>-1</sup> at 264 h of culture when only glucose was used.

**Keywords** Inductive effect · Gibberellic acid · Mixed carbon source · *Gibberella fujikuroi*

E. Y. Rios-Iribe  
Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro,  
Cerro de las Campanas S/N, Col. Las Campanas Apartado Postal  
184, C.P. 76010 Querétaro, Querétaro, Mexico

L. B. Flores-Cotera  
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de  
Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico  
Nacional, Ave. Politécnico 2508, C.P. 07360 Mexico DF,  
Mexico

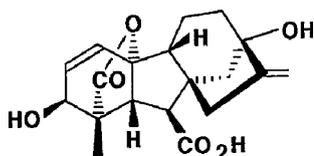
M. M. G. Chávira  
Laboratorio de Biotecnología, Instituto Nacional de  
Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km 6.5  
Carretera Celaya-San Miguel de Allende S/N. Col. Roque,  
C.P. 38110 Celaya, Guanajuato, Mexico

G. González-Alatorre · E. M. Escamilla-Silva (✉)  
Departamento de Ingeniería Química, Instituto Tecnológico de  
Celaya, Av. Tecnológico y Antonio García Cubas S/N,  
C.P. 38010 Celaya, Guanajuato, Mexico  
e-mail: eleazar@iqcelaya.itc.mx

## Introduction

Since the discovery of gibberellins in 1935 by Yabuta (1935), there has been continued interest in the study of their biosynthesis and how they act. The enzymes involved in each stage of the metabolism are not known systematically nor how the genes that initiate their production shoot off. With regards to the production process of gibberellins there are many points to study. To date, more than 126 GAs have been identified from these natural sources (Tudzynski 1999; Shukla et al. 2003). Some of these GAs act as natural plant hormones, controlling developmental processes such as the induction of hydrolytic enzyme activity during seed germination, stem elongation, flower induction and pericarp growth (Rojas et al. 2001). As a result of these properties and their commercial applications, there has been considerable interest in the GAs over the last half-century, leading to many reviews of their biosynthesis (MacMillan 1997). The commercial source of the GAs, especially the bioactive

compound gibberellic acid (GA<sub>3</sub>; Fig. 1), is obtained by fermentation of the rice pathogen fungus, *Gibberella fujikuroi*, from which the GAs were originally discovered (Phinney 1983) and capable of producing large amounts of GA<sub>3</sub> during the secondary metabolism (Linnemannstönns et al. 1999; Escamilla-Silva et al. 1999). Various investigations have shown that the choice of carbon source during the processes of microbial fermentation for the production of metabolites directly affects their performance. The majority of experimental developments on fermentative processes have chosen glucose as the carbon source. This is based on the fact that glycolysis is present in a large variety of living organisms and is the fastest pathway to meeting the energy needs of cell functions. The production of GAs through *G. fujikuroi* has been no exception, since their main lines of investigation are based on the use of glucose; even the maximum reported production of GA<sub>3</sub> used this source of carbon (Escamilla et al. 2000). However, the need to improve the production of GAs through *G. fujikuroi*, has led to the search for new sources of carbon, focusing primarily on the use of natural oils. Some reports suggested that flour and oil plant extracts might contain precursors or inducers of the GA pathway (Rademacher 1994; Vass and Jefferys 1979). In fact, Muromtsev and Agnistova (1984) and Gancheva et al. (1984) have successfully used plant oils,

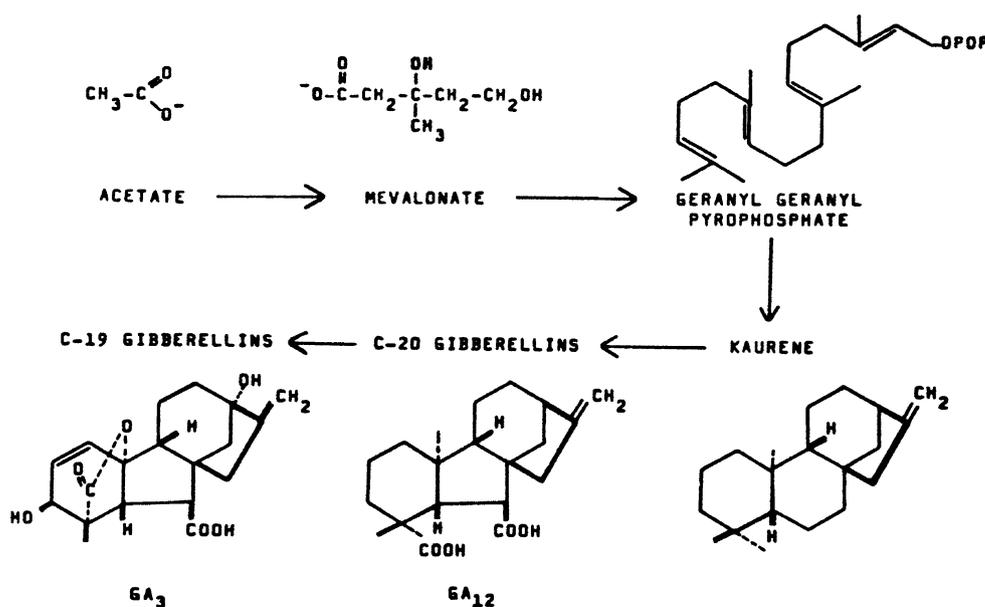


**Fig. 1** The structure of the biologically most active gibberellin (GA<sub>3</sub>)

e.g. sunflower oil, for GA productions. In our laboratory we have already conducted research using sesame, safflower, corn, and rice and sunflower oils for the production of GAs (Negrete-Rodríguez 2002; Almanza-Rangel 2005) and have concluded that the acetyl-CoA is a central intermediary of oxidative metabolism in mitochondria. This is derived from the decarboxylation of the pyruvate obtained by the bio-conversion of carbohydrates for a glycolysis pathway, and transamination of some amino acids together with the source of acetyl-CoA, corresponding  $\beta$ -oxidation of the fatty acids. In addition to the biochemical function of acetyl-CoA within the citric acid cycle, there are other biological functions of vital importance, emphasizing the metabolic source of all carbon atoms in the synthesis of fatty acids. Additionally, in certain living organisms, the acetyl-CoA along with acetatoacetyl-CoA and water, condense through the action of enzyme hydroxymethylglutaryl-CoA synthase to form hydroxymethylglutaryl-CoA (Fig. 2), a precursor for GAs via the mevalonic acid pathway.

The main objective of this work was to study an alternative strategy for increasing GA<sub>3</sub> production by *G. fujikuroi*, using a combination of glucose and vegetal oil as a carbon source during the fermentation process and a reduction in the activation time of the production of GA<sub>3</sub> due to the immediate availability of fatty acids and glycerol for the microbial cell. An increase in the production of GA<sub>3</sub> is therefore expected; a positive effect because of the acetyl-CoA occurring during the decarboxylation of pyruvate from the glycolysis that may be used for the production of secondary metabolites. It is important to note that until now neither item has been reported in any scientific research, which makes the project both interesting and ground-breaking.

**Fig. 2** Acetyl-CoA: precursor for gibberellins via hydroxymethylglutaryl-CoA



## Materials and methods

*Gibberella fujikuroi* strain CDBB H-984 maintained on potato dextrose agar slants at 4°C and sub-cultured every 2 months was used in the present work (Culture collection of the Department of Biotechnology and Bioengineering, CINVESTAV-IPN, Mexico). Fully developed mycelia materials from a slant were removed by adding an isotonic solution (0.9% NaCl). The removed mycelium (2 ml) was used to inoculate 250 ml of fresh culture medium contained in an Erlenmeyer flask. The flask was placed in a radial shaker (280 rev min<sup>-1</sup>) for 38 h at 29 ± 2°C. Subsequently, 200 ml contents of the flask were used to inoculate 3,800 ml of culture medium contained in the stirred tank bioreactor. The culture medium employed for the inoculums preparation is reported by Escamilla et al. (2000).

A Continuo Stirrer Tank Bioreactor (CSTB; Applikon, The Nederland, 7 l) was used, which operates mechanically mixing the air-sparged to the liquid medium and jacket type to recycle water for control of temperature. It is also equipped with pH and dissolved oxygen sensors to control these variables by a bio-controller. The Bio-expert software was used to record all the parameters throughout the fermentation time. Moreover it allows material to be fed or removed from the bioreactor employing peristaltic pumps.

The typical culture medium contained glucose or glucose-corn oil mixture as the carbon source on the basis of 40 g of carbon source, 2 g l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 3 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 and 2 ml l<sup>-1</sup> of trace elements. A stock solution of the trace elements used contained (g l<sup>-1</sup>) 1.0 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.5 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.2 MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O and 1.0 ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. A pH value of 3.5, 29°C, 600 rev min<sup>-1</sup> agitation and 1 vvm aeration were maintained and controlled with a bio-controller connected to the bioreactor, throughout the culture time. Samples were taken over a 240 h period and stored at 4°C prior to analysis.

Fungi were harvested by filtration (under reduced pressure) through pre-weighed oven-dried nitrocellulose membranes (0.45 µm pore size). After drying at 90°C to constant weight, the biomass was quantified by the dry weight method. Lipids were determined gravimetrically after the extraction with hexane and were rota-evaporate for hexane recuperation in a rota evaporator (Büchi Switzerland) and dried for 1 h in vacuum oven at 90°C and. Residual NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in the fermentation broth was assayed by the Kjeldahl method (A.O.A.C. 1990), and residual glucose was measured by the DNS method (Miller 1959).

### Determination of gibberellic acid

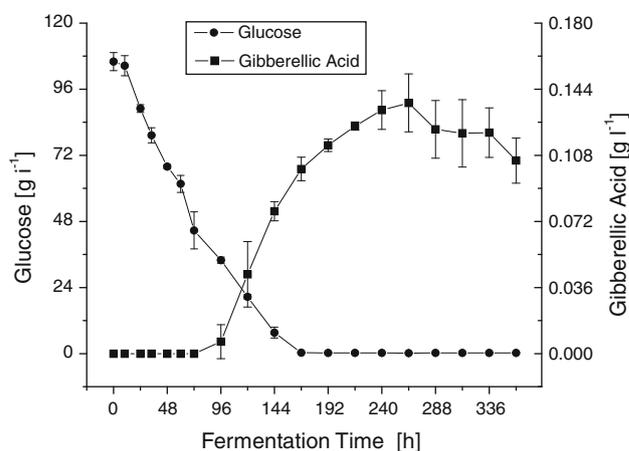
The quantitative determination of gibberellic acid (Shchegolev and Kucherov 2005; Ge et al. 2007) by

different methods reported a wide variation of GA<sub>3</sub> concentration between one method and another, but enabled a comparison to be made with bioassays and establish a correlation between them. In this paper we report the analysis by HPLC and in a subsequent paper we will report in particular the results obtained using different methods and the equivalences between them. The GA<sub>3</sub> in the culture fluid was quantified by HPLC using a Varian 9012 Chromatograph after extracting 10 mL samples of culture filtrate before adjusting to pH 2.0 with HCl 0.1 M, with three 10 ml portions of ethyl acetate. The organic fractions were rotary evaporated and the residue taken up in 3 mL of methanol. GA<sub>3</sub> was identified and quantified by reference to a GA<sub>3</sub> standard (Sigma–Aldrich), Negrete-Rodríguez (2002).

## Results and discussion

Different studies conducted in this work showed that gibberellins production begins when the source of nitrogen is exhausted. Comparisons made with a mixture of carbon sources; one that was easily assimilated and another that assimilated slowly, producing an inductive effect: reducing the time before gibberellins production begins, and increasing the concentration of gibberellins, especially gibberellic acid, as can be seen in the following results.

Figure 3 shows the relation between glucose uptake and gibberellic acid throughout the fermentation time. It can be observed for 96 h, the rate of glucose consumption over the exponential period, the fungus only uses the glucose for its growth and in a respiratory chain. At the end of this period the secondary metabolism with the gibberellins production began. Glucose uptake follows a first order kinetics and its concentration decreases as zero-order changes. This shows



**Fig. 3** Gibberellic acid (filled square) production obtained with medium containing only glucose (filled diamond) as carbon source

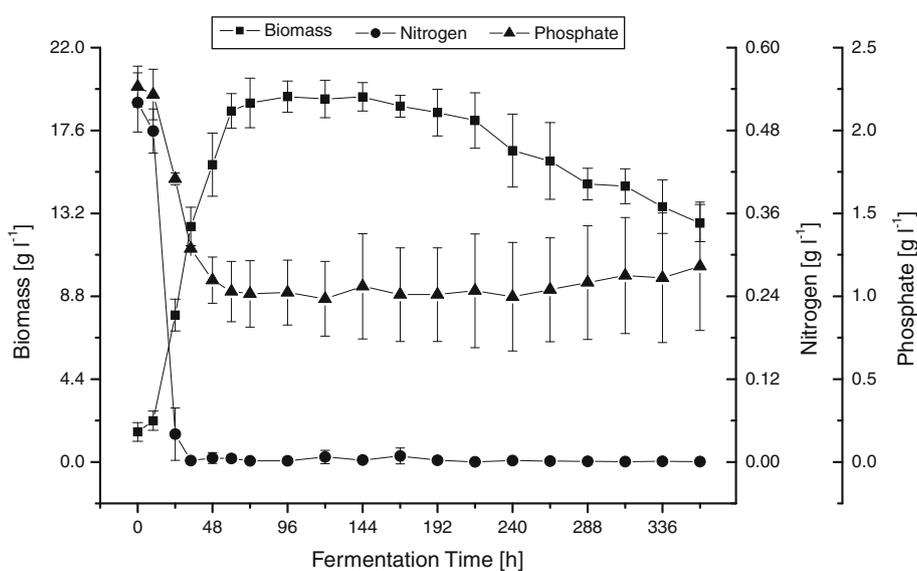
that glucose is used practically for the growth of microorganisms and stores up to 40% for maintenance and this is where the kinetics of fungus growth changes (Brückner and Blechschmidt 1991). At 240 h the maximal  $GA_3$  was reached, after this time the reserve of glucose was used by the fungus and the  $GA_3$  production began to decline.

Figure 4 shows the dynamics of consumption of nitrogen, phosphorus and its relationship with biomass production. It can be seen that in less than 46 h the nitrogen is depleted and it is at this point where gibberellins biosynthesis shoots up through the glutamine, which is what governs the metabolic flux. Moreover, the dynamics of the phosphorous consumption during the growth period of *G. fujikuroi* can be observed in this figure, a stage where it

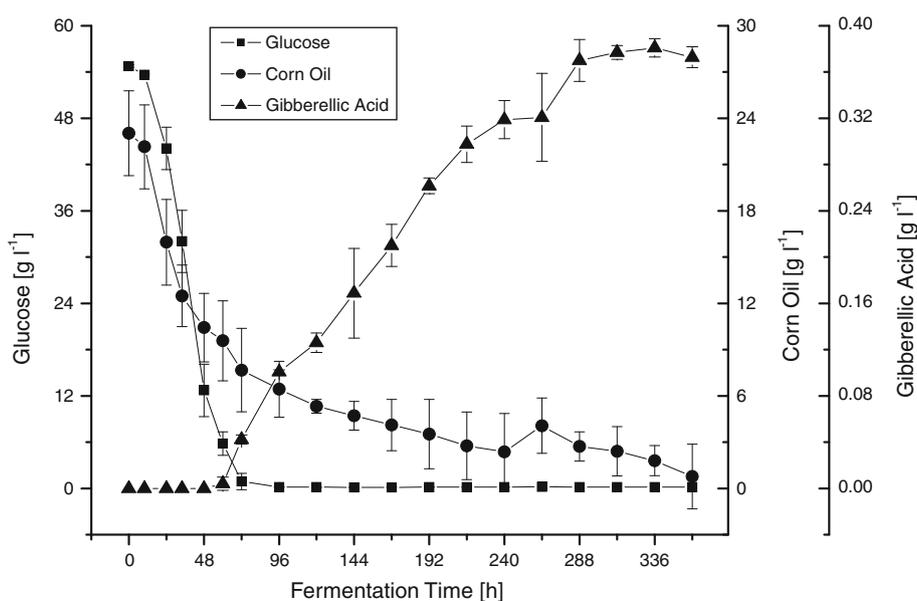
is used for the production of ATP to metabolize glucose during the first 46 h of fermentation, and after this time remains constant throughout the process. Interestingly, when nitrogen and glucose sources were exhausted, maximum biomass was achieved, between 48 and 60 h, whereas maximum production of gibberellins is achieved after 230 h, a fact which shows that gibberellins are not associated with microbial growth.

Figure 5 shows the kinetics of production of  $GA_3$  when using a mixture of glucose and corn oil as a carbon source. It illustrates how the glucose is depleted in an exponential way, indicating that the microorganism used it for their growth, whereas the corn oil hydrolyzes first, a fact demonstrated by the presence of a large concentration of

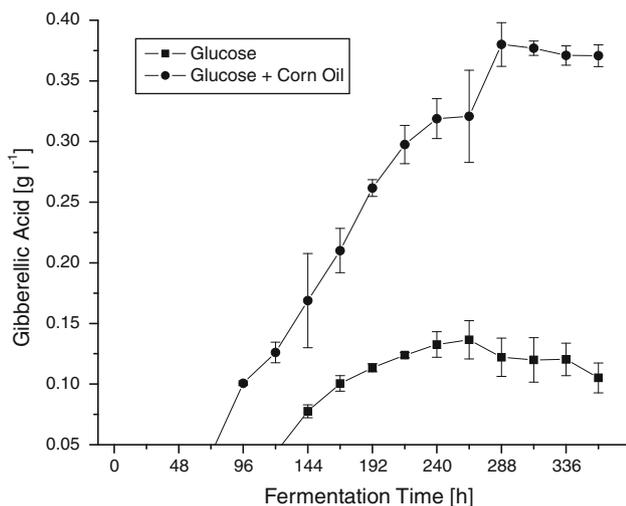
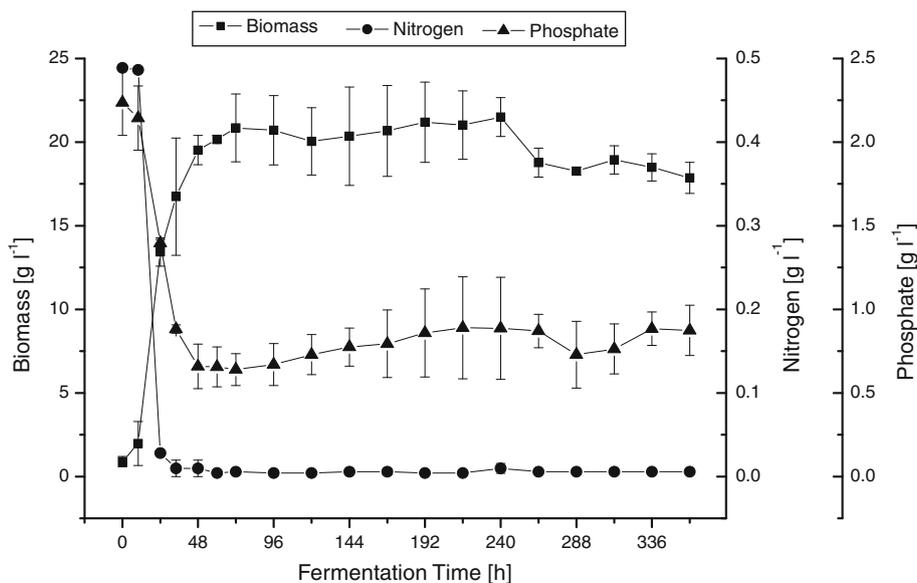
**Fig. 4** Biomass (filled square) growth, nitrogen (filled diamond) and phosphate (filled triangle) uptake dynamics in the fermentation process using glucose as carbon source only



**Fig. 5** Kinetics of gibberellic acid (filled triangle) production using a glucose (filled square)—corn oil (filled diamond) mixture as carbon source



**Fig. 6** Biomass growth (filled square), nitrogen (filled diamond) and phosphate (filled triangle) uptake dynamics in the fermentation process using a mixture of glucose–corn oil as carbon source

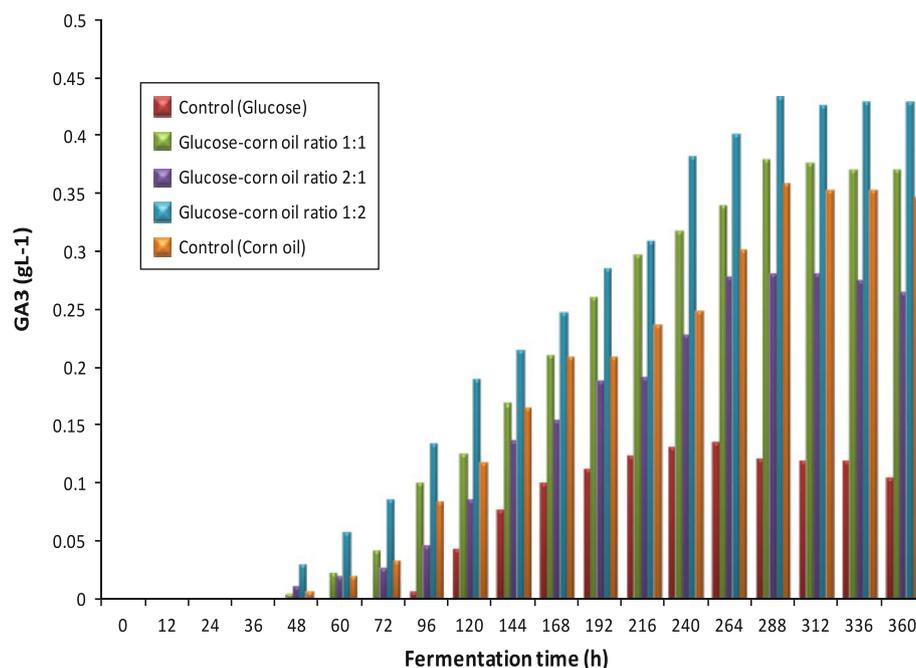


**Fig. 7** The effect of the glucose (filled square) and glucose + corn oil (filled diamond) mixture as carbon source on the production of gibberellic acid by *G. fujikuroi*

lipases. Corn oil enabled the growth rate of the fungus to be regulated from 96 to 350 h, which is very important because the period of production of GA<sub>3</sub> was linear from 96 to 240 h, achieving a maximum at around 280 h. A quickly metabolized substrate such as glucose and nitrogen may often achieve maximum cell growth rates as can be seen in Fig. 6, but is known to inhibit the production of many secondary metabolites. This “catabolite repression” is thought to be due to intermediates generated from the rapid catabolism of glucose interfering with enzymes in the secondary metabolism process (Marwick et al. 1999). Therefore, plant oils as a carbon source are not only inert for carbon catabolite repression but also make available a

pool of acetyl-CoA and additionally might contain natural precursors for GA biosynthesis (Vass and Jefferys 1979; Tudzynski 1999). Fast-growing cells generally have secondary metabolism “switched off” until their growth rate slows, via feedback inhibition. This can lead to a fully biphasic fermentation profile, with no production during growth, only during the stationary phase (Marwick et al. 1999; Chávez-Parga et al. 2008). This fact makes it interesting to use of a combination of an easily assailable carbon source and another with slow assimilation as shown in this investigation. Jacklin et al. (2000) reported the study of the interaction between the biosynthesis of fatty acids and GAs by *Fusarium moniliforme* linked to providing a novel method to maximize the production of GA<sub>3</sub>, through lipid-to-gibberellins metabolic switching. Basically, the experiment aimed to inhibit cell growth by adding sesamol to the fermentation medium. This resulted in the primary metabolism being blocked without any involvement on the secondary metabolism, because sesamol inhibited growth by about 40% and lipid accumulation by 35%. With GA<sub>3</sub> counterparts, accumulation was increased 20-fold, to a specific production of 63 mg g<sup>-1</sup> biomass. A metabolic analysis of these biological phenomena indicated that the acetyl-CoA for the biosynthesis of fatty acids is switched to the synthesis of GA<sub>3</sub>. Therefore, on *F. moniliforme*, GAs and lipids are synthesized from a common precursor, acetyl-CoA. In accordance with our data we may assume that using a glucose- corn oil mixture as the carbon source the lipid requirements of cell functions could be satisfied by the catabolism of the corn oil, which minimizes the use of acetyl-CoA in the biosynthesis of fatty acids, and thus increases the flux of acetyl-CoA to GA<sub>3</sub>. In a similar way to carbon, the nitrogen source is understood to regulate

**Fig. 8** The effects of diverse glucose–corn oil ratios on gibberellic production during the fermentation time by *G. fujikuroi*



secondary metabolism. The biosynthesis of GAs as secondary metabolites reduces its production in *G. fujikuroi* by regulating the source of nitrogen, beginning after the nitrogen source depletion (Rybakov and Bourd 1991; Sánchez-Fernández et al. 1997; Giordano et al. 1999). These data showed that GA<sub>3</sub> production began after nitrogen exhaustion and Escamilla et al. (2000), found that in *G. fujikuroi* the exponential growth ceases when the nitrogen source is depleted in the culture medium and occurs within the idiophase. This is characterized by initiating the formation of G<sub>AS</sub> by the promotion of the biosynthesis of glutamine, which is the basis for the genes cluster, a set of synthetases. A group of these are six of the seven cloned genes under control of the positively acting general transcription factor AREA (Tudzynski 1999; Mihlan et al. 2003). High levels of preferred nitrogenous compounds can drastically reduce the expression of GA-biosynthetic genes and GA amounts produced. Phosphate, although essential for growth, can at certain concentrations suppress secondary metabolism, inhibiting, for example, phosphatases and oxygenases (Spizek and Tichy 1995; Chávez-Parga et al. 2007). In *G. fujikuroi* the GAs biosynthesis is not regulated by phosphate concentration or rate of growth (Giordano et al. 1999).

As shown in Fig. 7, the secondary metabolism began around 60 h of culture and a production of 380 mg GA<sub>3</sub>L<sup>-1</sup> after 288 h of fermentation was obtained when the mixture glucose-corn oil was employed. This is in contrast to the 136 mg GA<sub>3</sub>L<sup>-1</sup> at 264 h of culture when only glucose was used, and the GA<sub>3</sub> production began around 96 h of fermentation as can see in Fig. 7. The results

clearly indicate that the carbon source produced an inductive effect in the secondary metabolism and affected the fermentation time and the phytohormone production during the fermentation process of *G. fujikuroi* on the conditions studied (Fig. 8).

## Conclusion

As for the assumption of the existence of a regulatory mechanism of glucose absorption from corn oil, the results clearly showed that both carbon sources are metabolized quickly, which means that glucose does not exert catabolic repression on assimilation corn oil, or some kind of metabolic control in the transport of fatty acids in the cells of *G. fujikuroi*. When using a mixture of carbon sources has been an increase in the production of gibberellic acid than when using only glucose and a decrease in time when production of GA<sub>3</sub> is initiated.

**Acknowledgments** The research was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación Secretaría agropecuaria (SAGARPA) grant-2004-C01-77, Dirección General de Estudios Superiores Tecnológicos (DGEST) grant-2141.09-P and Ms Alison S. Williams for technical assistance.

## References

Almanza-Rangel S (2005) MSc Thesis: Estudio del efecto de la relación C-N provenientes de harina y aceite de arroz sobre la producción de GA<sub>3</sub>. Instituto Tecnológico de Celaya

- A.O.A.C. (1990) Official methods of analysis 15th edition of the association of official chemists. A.O.A.C., Washington, DC
- Brückner B, Blechschmidt D (1991) The gibberellin fermentation. *Crit Rev Biotechnol* 11(2):163–192
- Chávez-Parga MC, Gonzalez-Ortega O, Negrete-Rodríguez MLX, Medina-Torres L, Silva EME (2007) Hydrodynamics, mass transfer and rheological studies of gibberellic acid production in an airlift bioreactor. *World J Microbiol Biotechnol* 23:615–623
- Chávez-Parga MC, Gonzalez-Ortega O, de la Luz X Negrete-Rodríguez Ma, Vallarino IG, Alatorre GG, Escamilla-Silva EM (2008) Kinetic modelling, airlift bioreactor, gibberellic acid, bikaverin. *Gibberella fujikuroi*. *Process Biochem* 43:855–860
- Escamilla 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. *J Biotechnol* 76:147–155
- Escamilla-Silva EM, Dendooven L, Uscanga-José A, Monroy RAI, González-Alatorre G, de la Torre Martínez M (1999) Morphological development and gibberellin production by different strains of *Gibberella fujikuroi* in shake flasks and bioreactor. *World J Microbiol Biotechnol* 15:753–755
- Gancheva V, Dimova T, Kamenov K, Foutekova M (1984) Biosynthesis of gibberellins III. Optimization of nutrient medium for biosynthesis of gibberellins upon using mathematical methods for planning the experiments. *Acta Microbiol Bulgarica* 14:80
- Ge L, Peh CYC, Yong JWH, Tan SN, Lin H, Ong SE (2007) Analyses of gibberellins by capillary electrophoresis—mass spectrometry combined with solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 1159:242–249
- Giordano W, Avalos J, Cerdá-Olmedo E, Doménech CE (1999) Nitrogen availability and production of bikaverin and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiol Lett* 173:389–393
- Jacklin A, Ratledge C, Wynn JP (2000) Lipid-to-gibberellin metabolic switching in *Fusarium moniliforme* via the action of sesamol. *Biotechnol Lett* 22(24):1983–1986
- Linnemannstönns P, Vob T, Hedden P, Gaskin P, Tudzynski B (1999) Deletions in the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi* by restriction enzyme-mediated integration and conventional transformation-mediated mutagenesis. *Appl Environ Microbiol* 65(6):2558–2564
- MacMillan J (1997) Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. *Nat Prod Rep* 1:221–243
- Marwick JD, Wright PC, Burgess JG (1999) Bioprocess intensification for production of novel marine bacterial antibiotics through bioreactor operation and design. *Marin Biotechnol* 1:495–507
- Mihlan M, Homann V, Liu TWD, Tudzynski B (2003) AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Mol Microbiol* 47:975–991
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31:426–428
- Muromtsev GS, Agnistova VN (1984) In: Letunova SV (ed) *Gibberellins*. Nauka, Moscow (in Russian)
- Negrete-Rodríguez X (2002) MSc Thesis: Producción de ácido giberélico en biorreactor de tanque agitado con *Gibberella fujikuroi* empleando aceite de maíz como fuente de carbono. Instituto Tecnológico de Celaya
- Phinney BO (1983) The history of gibberellins. In: Crozier A (ed) *The biochemistry and physiology of gibberellins*, vol 1. Praeger, New York, pp 19–52
- Rademacher W (1994) Gibberellin formation in microorganisms. *Plant Growth Regul* 15:303–314
- Rojas MC, Hedden P, Gaskin P, Tudzynski B (2001) The P450-1 gene of *Gibberella fujikuroi* encodes a multifunctional enzyme in gibberellin biosynthesis. *Microbiol* 98(10):5838–5843
- Rybakov YA, Bourd GI (1991) Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis enzyme complex in *Fusarium moniliforme*. *J Biotechnol* 21:219–228
- Sánchez-Fernández R, Avalos J, Cerdá-Olmedo E (1997) Inhibition of gibberellin biosynthesis by nitrate in *Gibberella fujikuroi*. *FEBS Lett* 413:35–39
- Shchegolev AA, Kucherov VF (2005) The use of gas-liquid chromatography for the analysis of gibberellins and related compounds. *Russ Chem Bull* 18(6):1117–1119
- Shukla R, Srivastava AK, Chand S (2003) Bioprocess strategies and recovery processes in gibberellic acid fermentation. *Biotechnol Bioproc Engin* 8:269–278
- Spizek J, Tichy P (1995) Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Folia Microbiol* 40:43–50
- Tudzynski B (1999) Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:298–310
- Vass RC, Jefferys EG (1979) Gibberellic acid. Chapter 9. In: Rose AH (ed) *Economic microbiology*, vol 3. Academic Press, London
- Yabuta T (1935) Biochemistry of the “bakanae” fungus of rice. *Ag Hort* 10:17–22