



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA.

Optimización de la producción de ácido giberélico en cultivo sumergido.

TESIS.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOTECNÓLOGO

PRESENTA: Jiménez Sierra César Agustín.

Asesor de tesis: Dr. Enrique Durán Páramo
Departamento de Bioprocesos, UPIBI-IPN

México, D.F. NOVIEMBRE, 2007



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO
SUBDIRECTOR ACADÉMICO DE LA UPBI-IPN
Presente.

*ASUNTO: Aval de Calidad
Académica de trabajo de Tesis*

Los abajo firmantes, designados por la Subdirección Académica como miembros del Jurado Calificador del trabajo de tesis titulado "Optimización de la producción de ácido giberélico en cultivo sumergido", que presenta el C. CESAR AGUSTIN JIMENEZ SIERRA, egresado y pasante de la carrera de Ingeniería Biotecnológica, boleta número 2001620161, informamos que después de haber revisado cuidadosamente el informe escrito, consideramos que reúne las características de calidad académica que se requieren para aspirar a la obtención del título mencionado.

Por lo anterior, otorgamos nuestro aval para que continúen los trámites de titulación y se proceda a programar el examen profesional correspondiente, de acuerdo al artículo 39 del Reglamento de Titulación Profesional vigente en nuestro instituto.

NOMBRE	FIRMA
DR. SERGIO GARCÍA SALAS PRESIDENTE	
DR. ENRIQUE DURÁN PÁRAMO SECRETARIO	
M. EN C. LEOBARDO ORDAZ CONTRERAS PRIMER VOCAL	
M. EN C. CARLOS OROZCO ÁLVAREZ SEGUNDO VOCAL	
M. EN C. JOSÉ MANUEL MUÑOZ AGUILAR TERCER VOCAL	

Se extiende el presente a los 10 días del mes de Junio del año 2007

AGRADECIMIENTOS.

A Dios, Por crearme y en la existencia conservarme;

A Siegfried, por velarme y del mal guardarme;

A mis Padres, por criarme;

A mi familia, por educarme;

A mis Profesores, por enseñarme;

A mis amigos, por tolerarme;

A mi asesor, por darme esta oportunidad;

Y a todos aquellos que han contribuido en esta tesis y en mi vida;

A Todos ustedes, Gracias.

Sentencia de Dios al hombre
antes que el día comience:
"Que el pan no venga a tu mesa
sin el sudor de tu frente.

Ni el sol se te da de balde,
ni el aire por ser quien eres:
las cosas son herramientas
y buscan quien las maneje.

El mar les pone corazas
de sal amarga a los peces;
el hondo sol campesino
madura a fuego las mieses.

La piedra, con ser la piedra,
guarda una chispa caliente,
y en el rumor de la nube
combaten el rayo y la nieve.

A ti te inventé las manos
y un corazón que no duerme;
puse en tu boca palabras
y pensamiento en tu frente.

No basta con dar las gracias
sin dar lo que las merece:
a fuerza de gratitudes
se vuelve la tierra estéril."

ÍNDICE

	Página.
1. Resumen	6
2. Antecedentes.	7
2.1 Historia de las giberelinas	7
2.2 Importancia de las giberelinas	9
2.3 Metabolismo de <i>Gibberella fujikuroi</i>	10
2.4 Efecto de la concentración de nutrientes	11
2.5 Efecto de las condiciones de cultivo	12
2.6 Superficies de respuesta	13
2.7 Análisis de varianza.	15
3. Justificación.	17
4. Objetivos.	19
5. Metodología.	20
5.1 Reactivación e identificación de las cepas	20
5.2 Modelo experimental	21
5.3 Fermentaciones en matraz	22
5.4 Fermentaciones en biorreactor	23
5.5 Determinación de glucosa	24
5.6 Determinación de amonio	24
5.7 Determinación de biomasa	24
5.8 Determinación de ácido giberélico	25

6. Resultados	26
6.1 Recuperación de la cepa	26
6.2 Cuantificación de ácido giberélico	26
6.3 Selección del modelo experimental	27
6.4 Codificación para las cinéticas en matraz	28
6.5 Cinéticas en matraz, <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2278	28
6.6 Cinéticas en matraz, <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2284	31
6.7 Cinéticas en biorreactor	34
7. Análisis de resultados	37
7.1 Determinación de ácido giberélico	37
7.2 Modelo experimental	37
7.3 Cinéticas en matraz	37
7.4 Cinéticas en biorreactor	38
8. Conclusiones	40
9. Perspectivas.	41
10. Bibliografía.	42
Anexo I (Gráficas)	44
Anexo II (Ruta metabólica de síntesis de GA3)	66

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Usos del ácido giberélico.	9
Cuadro 2: Análisis de varianza.	16
Cuadro 3. Medio empleado por Álvarez y Molina.	22
Cuadro 4: Codificación de las variables para la cinética de producción de AG ₃ en matraz .	28
Cuadro 5: Concentraciones finales de ácido giberélico AG ₃ en matraz por <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2278.	29
Cuadro 6: Análisis de varianza para la producción de ácido giberélico en matraz con <i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL 2278.	31
Cuadro 7: Concentraciones finales de ácido giberélico AG ₃ en matraz por <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2284.	32
Cuadro 8: Análisis de varianza para la producción de ácido giberélico en matraz con <i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL 2284.	34
Cuadro 9: Codificación de variables para la producción de ácido giberélico en biorreactor con <i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL 2284.	34
Cuadro 10: Concentraciones finales de ácido giberélico AG ₃ en fermentador por <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2284.	35
Cuadro 11: Análisis de varianza para la producción de ácido giberélico en biorreactor con <i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL 2284.	36

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura No. 1 Estructura química del ácido giberélico (AG ₃)	7
Figura No. 2: Concentraciones de las fuentes de nitrógeno en la relación N:N.	22
Figura No. 3: Concentraciones de nitrógeno y glucosa en la relación C:N.	23
Figura No. 4: Micelio y ascosporas de <i>Gibberella</i>	26
Figura No. 5: Curva patrón de AG ₃ en electroforesis capilar.	27
Figura No. 6: Área de experimentación en el plano de las variables X ₁ y X ₂	27
Figura No. 7: Cinética de producción en matraz, <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2278, experimento 5	28
Figura No. 8: Superficie de respuesta y gráfica de contornos para la Predicción de la producción de AG ₃ por <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2278 en matraz.	30
Figura No. 9: Superficie de respuesta de la zona experimental para la Predicción de la producción de AG ₃ por <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2278 en matraz	30
Figura No. 10: Cinética de producción en matraz, <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2284, experimento 5	31
Figura No. 11: Superficie de respuesta y gráfica de contornos para la predicción de la producción de AG ₃ por <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2284 en matraz.	33
Figura No. 12: Superficie de respuesta de la zona experimental para la predicción de la producción de AG ₃ por <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2284 en matraz.	33
Figura No. 13: Cinética de producción en biorreactor, <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2284, experimento 12	35
Figura No. 14: Superficie de respuesta de la zona experimental para la de la producción de AG ₃ por <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2284 en biorreactor.	36

1. RESUMEN.

Las giberelinas constituyen un importante grupo de hormonas vegetales relacionadas con el crecimiento y desarrollo de numerosas plantas superiores. Estas hormonas pueden ser producidas por diversos microorganismos, empleándose en las fermentaciones industriales a *Gibberella fujikuroi* para su biosíntesis.

Entre todas las giberelinas, el ácido giberélico (AG_3) es el que presenta mayor actividad biológica, y en esto radica el interés comercial en esta fitohormona. En su nivel de producción intervienen numerosos parámetros, muchos de ellos ya estudiados, pero el nivel óptimo de estas variables presenta diferencias respecto a la cepa empleada.

Gibberella fujikuroi produce ácido giberélico como parte de su metabolismo secundario, cuya síntesis comienza cuando la fuente de nitrógeno es agotada en el medio de cultivo. Su producción es proporcional a la concentración inicial de nitrógeno y a la disponibilidad de carbono al agotarse el nitrógeno del medio.

El presente proyecto consistió en determinar algunas de las condiciones óptimas de cultivo (concentración inicial de glucosa, relación entre nitrógeno orgánico e inorgánico, relación carbono / nitrógeno y potencia por unidad de volumen), así como la interacción de los factores mencionados por medio de superficies de respuesta. Además, se probó el intervalo de confianza al que se ajusta este método de análisis estadístico para la optimización de las condiciones de la fermentación.

Se evaluó el efecto combinado de la concentración inicial de glucosa y la relación entre el nutriente complejo (agua de cocimiento de maíz) y fuente de carbono (glucosa) en fermentaciones en matraz. Los resultados obtenidos en estas fermentaciones fueron empleados para seleccionar entre las dos cepas de que se dispone (*Gibberella fujikuroi* NRRL 2278 y *Gibberella fujikuroi* NRRL 2284) a la que produjera la mayor concentración de AG_3 . La cepa seleccionada fue *G. fujikuroi* NRRL2284.

Posteriormente, se estudió el efecto combinado de la potencia por unidad de volumen y la relación carbono nitrógeno en biorreactor de 3 L en la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284. El resultado de este trabajo fue la optimización de la producción del ácido giberélico (AG_3) dentro de la UPIBI, pasando de 0.6 g/L a 0.78 g/L (Rel. C:N =15.62, P/V= 14.96 kW/hm³) a nivel biorreactor.

2. ANTECEDENTES.

Las Giberelinas constituyen una extensa familia de ácidos diterpenóicos, química y biológicamente derivados de hidrocarburos diterpenóicos tetracíclicos y representan un grupo importante de hormonas de crecimiento en el reino vegetal. Dentro de esta familia se han identificado más de 90 moléculas diferentes, siendo el ácido Giberélico (AG_3) y una mezcla de las giberelinas AG_4/AG_7 , aquellas con mayor actividad biológica, y por tanto de mayor interés comercial (6).

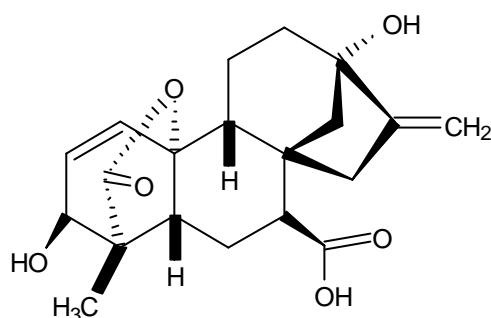


Figura No. 1 Estructura química del ácido giberélico (AG_3)

2.1. Historia de las giberelinas.

El conocimiento acerca de las giberelinas comenzó en 1898 con un reporte de Hori acerca de la enfermedad del arroz denominada “bakanae”, una de las más antiguas enfermedades de plantas en el oriente, especialmente en Japón. Las plantas infectadas son más delgadas, altas y de color amarillo pálido y tras un crecimiento rápido, perecen. Esto puede extenderse a otras plantas y reducir el rendimiento hasta en un 40%.

Hori descubrió que el agente causal de esta enfermedad es *Fusarium moniliforme*, un hongo imperfecto del suelo. En la etapa perfecta (sexual), el hongo resultó ser *Gibberella fujikuroi*. Sawada demostró en 1912 que la enfermedad del “bakanae” es generada por un estímulo del micelio, y en 1926 Kurosawa encontró que un metabolito del hongo era quien generaba esta enfermedad, a la cual denominó “toxina”.

Se llevaron a cabo estudios sobre las propiedades físicas y químicas de los metabolitos de este hongo y fue hasta 1934 que Yabuta logró cristalizar uno de ellos, al cual denominó ácido fusárico, un derivado del ácido picolínico, el cual producía inhibición del crecimiento en plantas, en menor medida que la enfermedad causada por el microorganismo. Al cambiar la composición del medio, Yabuta encontró una sustancia

monocristalina, con mayor actividad biológica a la cuál llamó “giberelina”. Esta fue la primera vez que se empleó el término giberelina para una sustancia con capacidad de estimular el crecimiento de plantas (14).

Durante la Segunda Guerra Mundial, se detuvieron los estudios relativos a este tema, pero al finalizar ésta, resurgió el interés en las giberelinas, ahora también en Gran Bretaña y Estados Unidos. En Gran Bretaña, el interés principal fue por parte de la empresa Imperial Chemical Industries (IC), donde se retomaron los estudios sobre la producción de las giberelinas. Se aisló una sustancia con gran actividad biológica, la cuál fue denominada ácido giberélico (posteriormente llamada AG₃), cuya fórmula es C₁₉H₂₂O₆, y cuyo efecto fisiológico difería del reportado por los japoneses, debido a diferencias en las condiciones de cultivo en que se obtuvo esta sustancia.

En Estados Unidos y Japón se aisló una giberelina con alta actividad biológica, denominada giberelina X por los norteamericanos y giberelina A₃ por los japoneses. Posteriormente se encontró que ambas correspondían al denominado ácido giberélico, por lo que éste nombre fue generalmente aceptado.

West y Phinney (1956) reportaron por primera vez la presencia del ácido Giberélico en plantas superiores, así como otras sustancias químicamente relacionadas y con actividad biológica similar, a las cuáles se denominó sustancias “similares a giberelinas”. En estudios posteriores, se han identificado más de 90 giberelinas, tanto en plantas como en microorganismos.

No se ha encontrado otro método de producción (además de la fermentación sumergida) comercialmente viable de estas fitohormonas, y dado que se han observado diferencias considerables en la producción de AG₃ entre distintas cepas de *Gibberella fujikuroi* empleadas (bajo las mismas condiciones de cultivo), resulta necesario optimizar la producción para cada cepa (11).

A pesar de que se ha demostrado la producción de giberelinas en varios hongos, levaduras, actinomicetos, bacterias y plantas superiores, únicamente *Gibberella fujikuroi* produce rendimientos suficientes para ser empleada comercialmente (14).

Se han llevado a cabo optimizaciones de las fermentaciones en diversos tipos de cultivo, tales como fermentación sumergida (2), fermentación en estado sólido (10), e incluso, fermentaciones en reactores de lecho fluidizado (8).

2. 2. Importancia de las giberelinas.

Las giberelinas son hormonas vegetales, que pueden ser producidas por plantas, hongos, levaduras, actinomicetos y bacterias. La ausencia o disminución de estas hormonas en plantas se relaciona con el enanismo y otras enfermedades.

Debido a esto, se ha generado un interés en el sector agrícola por estas hormonas, sobre todo en el ácido giberélico (AG₃), que puede ser producido industrialmente por fermentaciones con hongos filamentosos. Sus usos actualmente son numerosos, y algunos de ellos se presentan en el cuadro 1.

Producto	Efectos	Aplicación
Caña de azúcar	Incrementa los rendimientos en más de 10 toneladas por hectárea.	150 g de AG ₃ por hectárea; aplicación posible de extractos del medio, y giberelinas semipurificadas o cristalinas.
Papas.	Ruptura del aletargamiento.	Tratamiento por goteo inmediatamente después de plantar.
Alcachofa	Incrementa el número de cabezas por planta, adelanta la cosecha en varias semanas.	Solución de 120 ppm por aplicación foliar.
Ruibarbo	Rompe el aletargamiento, incrementa los rendimientos.	Aspersión de solución 50ppm de AG ₃ a las coronas de las plantas de ruibarbo.
Lúpulo	Incrementa los rendimientos hasta en 40%	Solución de 5 a 15 ppm por aplicación en spray a las coronas de las plantas.
Tomates	Incrementa los rendimientos	40 g por hectárea por aplicación con spray.

Además de esas aplicaciones, se ha observado que las giberelinas producen efectos positivos (para fines humanos) sobre microorganismos (incremento en la producción de enzimas y/o alcaloides, estimulación del crecimiento, resistencia a agentes tóxicos, etc.), algas (estimulación del crecimiento) e incluso animales (estimulación del crecimiento y de la actividad de algunos órganos), aunque debido a la escasez de giberelinas con suficiente grado de pureza (para evitar que existan interferencias o efectos secundarios) estos campos no han sido suficientemente explorados (14).

2.3. Metabolismo de *Gibberella fujikuroi*.

Un metabolito secundario es una sustancia producida durante la fase estacionaria del crecimiento para obtener una ventaja con respecto a posibles competidores.

Con el descubrimiento de las giberelinas y el interés por su uso en el sector agrícola, se iniciaron numerosos estudios relativos al metabolismo de *Gibberella fujikuroi*. Borrow *et al* (4) propusieron en uno de sus primeros estudios las fases del crecimiento de *G. fujikuroi* en cultivo agitado, las cuales poseen una aceptación general. Las fases propuestas son:

- a) **Fase de latencia.** No siempre se presenta, y es debida a la adaptación del microorganismo a un nuevo ambiente.
- b) **Fase de balance.** En la que se presenta un crecimiento y una tasa de consumo de nutrientes alta y termina con el agotamiento del primer nutriente (limitante).
- c) **Fase de transición.** Consiste en un cambio del metabolismo para adaptarse a las nuevas condiciones del medio.
- d) **Fase de almacenamiento.** Se sigue consumiendo la fuente de carbono y se incrementa el porcentaje de carbohidratos y lípidos en el micelio.
- e) **Fase de mantenimiento.** En esta fase se continúa metabolizando la fuente de carbono, aunque la composición del microorganismo es prácticamente constante.
- f) **Fase terminal.** Se produce el rompimiento micelial debido al agotamiento de la fuente de carbono y las reservas de nutrientes.

También existen estudios sobre la cinética de crecimiento y de producción de giberelinas, en los que se examinan los efectos de numerosos factores ambientales, nutrientes limitantes y nutrientes complejos, que se supone contienen algún precursor dentro de la ruta biosintética de las giberelinas (3, 8).

La producción del ácido giberélico comienza al agotarse la fuente de nitrógeno en el medio (5, 7, 15), ya que para *G. fujikuroi* el ácido giberélico es un metabolito secundario, que sintetiza únicamente cuando los nutrientes le son insuficientes, y utiliza esta hormona vegetal como parte de un proceso infectivo en plantas. Debido a esto, la mayor cantidad de estudios se han enfocado hacia las fermentaciones con nitrógeno limitante y por lo que se dispone de mayor información en este ámbito.

2.4. Efecto de la concentración de nutrientes.

Se han estudiado diversas fuentes de carbono pero, hasta ahora, se ha determinado que la glucosa promueve los mayores rendimientos, y se incrementa cuando se combina con un nutriente complejo como harina de soya, de maíz, de arroz, de frijol, aceites diversos, etc. (8 y 11). Se ha observado también que, al agotarse la fuente de nitrógeno, la concentración de glucosa residual afecta de manera importante la cantidad de ácido giberélico producido. Inicialmente, un aumento en la concentración de glucosa residual incrementa la producción de AG₃, pero al sobrepasar la concentración de 20%, la producción decrece, debido a inhibición por sustrato.

Es posible incrementar la producción de AG₃ mediante fermentaciones por lote alimentado suministrando, durante las fases de almacenamiento y mantenimiento, medio con glucosa (4 g / L) y sin fuente de nitrógeno. Sin embargo, esto genera una dilución del producto obtenido, lo que puede dificultar su recuperación y purificación.

En cuanto a la fuente de nitrógeno, se presentan diferencias considerables entre las distintas fuentes y las distintas cepas. En general, la producción de giberelinas es proporcional a la concentración inicial de nitrógeno, aunque a concentraciones superiores al 3%, la producción decrece. Además, el empleo de diferentes fuentes de nitrógeno genera distintos comportamientos en el pH (mientras algunas producen acidificación, otras generan alcalinización del medio), influenciando también de esta forma el rendimiento, ya que al salir del intervalo de pH de 3.5 a 5.5 cesa la producción de AG₃.

En cuanto a fósforo, magnesio y elementos traza (Fe, Mo, Mn, Zn, etc.), es conveniente formularlos en exceso para evitar inhibiciones del crecimiento debido a la escasez de alguno de estos elementos. Los elementos traza se deben formular en los medios de cultivo a nivel investigación, pero estos se encuentran ya presentes en las

impurezas de los reactivos empleados a nivel industrial (principalmente melazas), por lo que no es siempre necesario añadirlos en estos medios.

2.5. Efecto de las condiciones de cultivo.

Por lo que respecta a las condiciones de cultivo, se ha estudiado especialmente el efecto del pH, la temperatura y la luz.

La producción de AG₃ no presenta gran variación dentro del intervalo de pH de 3-5.5. Sin embargo, al salir de este intervalo, se comienzan a producir giberelinas de menor interés (debido a su menor actividad biológica). Durante la fase de crecimiento del microorganismo, no es indispensable el control de pH, pero durante la fase de producción éste debe encontrarse dentro del intervalo estipulado para obtener AG₃. Al salir del intervalo mencionado, tanto la tasa de producción como la productividad decrecen rápidamente (11).

En cuanto a la temperatura, se ha demostrado que *Gibberella fujikuroi* es capaz de crecer entre 2 y 38°C (2), encontrándose su temperatura óptima de crecimiento en los 32°C. Además, se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre la producción de AG₃, y se ha determinado que la temperatura óptima de producción se encuentra a los 29°C. No se han realizado estudios controlando la temperatura a 32°C durante la fase de crecimiento y a 29°C al finalizar ésta (etapa de producción), aunque es de esperar que el incremento en la producción de AG₃ con este método sea marginal (11).

Respecto al efecto de la iluminación, se ha observado un incremento en la producción cuando se suministra una iluminación constante (14). Este factor genera diversos efectos sobre el hongo, hecho que está reportado también durante su infección a plantas.

En referencia a la potencia suministrada por unidad de volumen, un factor de escalamiento (9), no se han realizado estudios. Es importante considerar esta variable debido a la sensibilidad de ciertos microorganismos al esfuerzo de corte.

Por otra parte, sí se han llevado a cabo estudios sobre la velocidad de aireación y agitación (10), en los que se ha observado que el incremento en la transferencia de oxígeno incrementa la producción de AG₃, debido a que provee al microorganismo de una mayor cantidad de oxígeno para llevar a cabo la ruta metabólica de síntesis de giberelinas

hasta el final. El ácido giberélico es uno de los últimos productos en la vía, y en caso de haber escasez de oxígeno, se producen otras giberelinas (GA4 y GA7).

Normalmente, la optimización al variar un parámetro a la vez es un método que requiere de tiempo, de numerosos datos analíticos y es incapaz de detectar interacciones entre dos o más variables. Debido a esto, es necesario emplear métodos estadísticos tales como las superficies de respuesta, diseños factoriales, el programa supersimplex para optimización y la aproximación por regresión múltiple en la optimización de fermentaciones, para poder resolver los problemas antes mencionados (14).

2.6. Superficies de respuesta.

Cuando se estudia el efecto de las diferencias en el valor de una variable sobre una respuesta o resultado, es común emplear el método de la regresión para elaborar un modelo que muestre el comportamiento de la respuesta en función de los distintos valores que puede tomar la variable. Sin embargo, previo al análisis de los datos y a la experimentación, es indispensable un diseño experimental, que permita un estudio preciso sobre la variable de interés dentro de ciertos límites.

Las superficies de respuesta, incluyen la aplicación de la regresión, así como de otras técnicas estadísticas con el fin de obtener un mayor conocimiento de las características del sistema de respuesta bajo estudio (12). Las superficies de respuesta pueden ser representadas como superficies tridimensionales, lo que permite una visualización más clara del sistema de respuesta.

Al igual que el método de regresión, existen métodos de superficies de respuesta de primer orden (planos), segundo orden (paraboloides) y de orden superior (superficies más complejas). Debido a que los fenómenos biológicos no presentan un comportamiento constante (lineal) en general, sino que decrecen en torno a un máximo, es necesario representar estos fenómenos por superficies de segundo orden o superior.

La fórmula matemática mediante la cuál se expresa una superficie de respuesta de segundo orden, con dos variables de estudio, es:

$$y = \mathbf{b}_0 + \mathbf{b}_1x_1 + \mathbf{b}_2x_2 + \mathbf{b}_3x_1^2 + \mathbf{b}_4x_2^2 + \mathbf{b}_5x_1x_2 + \mathbf{e}$$

Dónde:

y = Respuesta.

x_1 y x_2 = Variables bajo estudio.

β_n = Constantes del sistema.

ε = Error.

O, expresado en forma matricial:

$$y = X\mathbf{b} + \mathbf{e}$$

Dónde:

y = Matriz de respuesta.

X = Matriz de variables.

β = Matriz de constantes del sistema.

ε = Error

Para obtener una superficie de respuesta, es necesario conocer los valores de todas las constantes β dentro del modelo elegido. La forma general de obtener una superficie de respuesta, es emplear la siguiente fórmula:

$$\mathbf{b} = (X'X)^{-1} X'Y$$

Dónde:

β = Matriz de constantes.

X' = Matriz transpuesta de la matriz de datos.

X = Matriz de datos.

$(X'X)^{-1}$ = Matriz inversa del producto de matrices.

Y = Matriz de respuesta.

La matriz X o matriz de variables es el primer y más importante paso, ya que de la correcta selección del diseño experimental y de los límites de la variable a estudiar

depende que el futuro análisis de ésta junto con la matriz de respuesta se logre obtener un modelo aceptable.

Una vez que se ha obtenido el modelo, es necesario asignar valores ficticios a las variables estudiadas y predecir la respuesta bajo determinadas condiciones. Si se requiere, es posible obtener gráficamente la superficie tridimensional, aunque esto es facilitado en gran medida por el uso de computadoras y software diseñado para estas tareas.

2.7. ANÁLISIS DE VARIANZA.

Una vez que se ha obtenido un modelo para predecir el comportamiento de la variable de respuesta, es necesario hacer una prueba para evaluar la significancia de la regresión. Es decir que debemos evaluar si el comportamiento estimado por el modelo es similar al comportamiento observado experimentalmente. Las hipótesis a evaluar son:

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k = 0$$

$$H_1: \beta_j \neq 0 \text{ al menos para alguna } j.$$

Es decir, la hipótesis nula (H_0) postula que ninguno de los tratamientos (variables) produce un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de respuesta. Por su parte la hipótesis alterna (H_1) indica que al menos uno de los tratamientos produce un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de respuesta.

El rechazar la hipótesis nula implica que al menos una de las variables de regresión contribuye de manera significativa al modelo. El procedimiento de la prueba consiste en hacer una partición de la suma de cuadrados totales (S_{yy}) en una suma de cuadrados debida al modelo o regresión (SS_R) y una suma de cuadrados debida al residual o error (SS_E), de manera que :

$$S_{yy} = SS_R + SS_E$$

El procedimiento para probar H_0 consiste en calcular:

$$F_0 = \frac{SS_R/k}{SS_E/(n-k-1)} = \frac{MS_R}{MS_E}$$

y se rechaza H_0 si F_0 es mayor que $F_{\alpha, k, n-k-1}$. Esta prueba usualmente se resume en una tabla similar al cuadro 2 Este procedimiento se denomina análisis de varianza debido a que se basa en la variabilidad total de la variable y .

Cuadro 2: Análisis de varianza.				
Fuente de Variación	Suma de cuadrados.	Grados de libertad	Cuadrados medios.	F_0 (calculada)
Regresión.	SS_R	k	MS_R	MS_R / MS_E
Residual	SS_E	$n-k-1$	MS_E	
Total.	S_{yy}	$n-1$		

Para el cálculo de las sumas de cuadrados, tenemos:

$$SS_R = ((\mathbf{b}^T \cdot \mathbf{X}^T) \cdot Y) - \frac{\left(\sum_{i=1}^n Y_i\right)^2}{n}$$

$$SS_E = (Y^T \cdot Y) - ((\mathbf{b}^T \cdot \mathbf{X}^T) \cdot Y)$$

$$S_{yy} = (Y^T \cdot Y) - \frac{\left(\sum_{i=1}^n Y_i\right)^2}{n}$$

Cabe señalar que α se refiere al intervalo de confianza para el cuál se diseña o acepta la prueba. El intervalo de confianza se refiere al porcentaje de datos que caen dentro del modelo experimental producido u obtenido. Es decir, es el porcentaje de probabilidad de que el resultado arrojado por el modelo sea certero.

3. JUSTIFICACIÓN.

Es un hecho por todos conocido el que la población requiere y continuará requiriendo cada vez mayor cantidad de alimentos. Ante esta situación, se han propuesto como soluciones los agroquímicos sintéticos (revolución verde) y los alimentos transgénicos.

Tras varios años de uso intensivo, se ha observado la gran variedad de problemas que implica el uso de agroquímicos sintéticos: contaminan y empobrecen los suelos, generan problemas de salud en toda clase de seres vivos, generan resistencia en las plagas, entre muchos otros. Tras observar y evaluar todos estos problemas, se ha llegado a una conclusión: la tierra ya no puede soportar una segunda revolución verde. (17)

En cuanto a los alimentos transgénicos, no hay legislación ni estudios suficientes referentes a los riesgos que conlleva su uso y por lo tanto, se aplica el principio de precaución. Hay que considerar que, incluso, existen moratorias en diversos países contra el uso de estos productos, o que exigen sea debidamente etiquetado para permitir al consumidor decidir su consumo. En Europa, son preferidos los productos orgánicos a los transgénicos.

Debido a esto, es necesario buscar nuevas sustancias que incrementen los rendimientos en el campo agronómico sin contaminar el ambiente, sin dañar a la salud, y cuyo estudio de daños sea posible y sencillo para poder obtener una legislación favorable. Tales sustancias han resultado ser los controles naturales (agroquímicos orgánicos), tales como los bioinsecticidas y las fitohormonas (auxinas, giberelinas, etc.).

Se ha intentado producir AG₃ por diversos métodos, como son la fermentación en estado sólido, la síntesis química, fermentación sumergida e incluso la extracción a partir de plantas o granos. Entre todas estas, la más rentable comercialmente y, por lo tanto, la principalmente empleada es la fermentación sumergida.

En México, la mayor parte del AG₃ es de importación, y es empleado principalmente en el cultivo de plantas ornamentales. Al realizar una optimización del proceso de producción por fermentación sumergida, pretendemos facilitar e incluso hacer un poco más rentable y atractivo el que se estimule una producción nacional.

Al producir ácido giberélico por fermentación sumergida con *Gibberella fujikuroi*, debido a las diferencias en la productividad de las diversas cepas, resulta necesario optimizar cada aspecto de la producción de acuerdo a cada cepa empleada. El suministro de nutrientes complejos (precursores) permite incrementar la producción de ácido giberélico, por lo que se pretende determinar la relación óptima entre uno de estos (agua de cocimiento de maíz) con respecto a la fuente de nitrógeno inorgánico (sulfato de amonio), más fácilmente asimilable. También se busca evaluar el efecto de la concentración inicial de glucosa a nivel matraz.

4. OBJETIVOS.

4.1 GENERAL:

1. Optimizar la producción de ácido giberélico por *Gibberella fujikuroi* en cuanto a concentración inicial de glucosa, relación de nitrógeno, relación carbono nitrógeno y potencia por unidad de volumen.

4.2 PARTICULARES:

1. Seleccionar entre las cepas *G. fujikuroi* NRRL 2278 y NRRL 2284 a la mejor productora por fermentaciones en matraz.
2. Evaluar el efecto de la concentración inicial de glucosa sobre la producción de AG₃.
3. Evaluar el efecto de la relación nutriente complejo : fuente de nitrógeno sobre la producción de AG₃, en fermentaciones en matraz.
4. Evaluar el efecto de la potencia por unidad de volumen sobre la producción de AG₃, en fermentaciones en biorreactor de 3 litros.
5. Evaluar el efecto de la relación carbono : nitrógeno dentro de las fermentaciones en biorreactor.
6. Determinar la interacción entre las variables de estudio por medio de un modelo factorial.
7. Desarrollo del modelo de producción a partir de la superficie de respuesta.

5. METODOLOGÍA.

5.1 REACTIVACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA.

Las cepas *Gibberella fujikuroi* NRRL 2278 y *Gibberella fujikuroi* NRRL 2284 fueron inicialmente reactivadas en caldo nutritivo enriquecido con 2% de glucosa. Se conservaron por transferencia periódica cada dos meses a tubos inclinados de PDA (Agar papa y dextrosa).

En el laboratorio, se cuenta con esta cepa conservada en tubos de agar inclinado, placas de petri con agar congeladas y en liofilizados. Para la reactivación de las cepas se inocula con una asada 50 mL de caldo nutritivo + 2% de glucosa en un matraz erlenmeyer de 250 mL y se incuba a 29 °C y agitación a 120 rpm. Desafortunadamente, no se obtuvo crecimiento de ninguna cepa por este método.

Debido a esto, fue necesario probar diferentes medios, empleando los nutrientes que, según la bibliografía son adecuados para el desarrollo de este microorganismo. Los nutrientes empleados se indican a continuación, y sus concentraciones en el medio empleado se marcan en paréntesis, en unidades de gramos por litro.

- Glucosa (20)
- Agua de cocimiento de maíz (3)
- Caldo nutritivo (8)
- Extracto de levadura (5)
- Nitrato de amonio (0.5)
- Fosfato dibásico de potasio (2)
- Sulfato de magnesio (1)
- pH = 7.0
- Aforar con agua destilada a 1 L

La cepa fue recuperada en este medio a partir de un tubo de agar nutritivo inclinado, y para asegurar que se trataba de la cepa de interés se realizó un microcultivo para identificarla.

MICROCULTIVO (13).

Para la identificación de la cepa recuperada, se realizó un microcultivo (técnica de Ridell o cultivo en micro placas para identificación de hongos filamentosos), cuyo procedimiento se describe a continuación.

1. Cortar cuadros de agar de papa y dextrosa (PDA) de 1 cm por lado de una placa de agar estéril.

2. Colocar el cuadro de PDA en un portaobjetos, y éste a su vez sobre una varilla de vidrio doblada en "v" que se encuentra al interior de una caja de Petri estéril.
3. Tomar con un asa recta una muestra de una colonia aislada de la cepa a identificar.
4. Inocular por picadura en cada uno de los lados del cuadro de PDA.
5. Colocar sobre el cuadro de agar un cubreobjetos y presionar ligeramente para que se adhiera al medio.
6. Adicionar 10 mL de glicerol estéril al 10% en el fondo de la caja Petri.
7. Cubrir e incubar a 28 °C.
8. Realizar observaciones al menos cada 12 horas, buscando los cuerpos fructíferos.
9. En cuanto se observen los cuerpos fructíferos, retirar el glicerol con una pipeta Pasteur.
10. Adicionar 5 mL de formaldehído al 10% durante 15 minutos, para inactivar al hongo.
11. Retirar con cuidado el portaobjetos del cuadro de agar, y colocarlo sobre un portaobjetos que contenga una gota de azul de algodón lactofenol al 1%, y sellar la preparación.
12. Retirar el cuadro de agar del portaobjetos, colocar una gota del colorante antes mencionado en el lugar donde se encontraba el PDA, y sobre éste colocar un portaobjetos y sellar la preparación.
13. Observar las preparaciones al microscopio con los objetivos 10x y 40x.
14. Comparar la forma y estructura de los cuerpos fructíferos observados con los reportados en la bibliografía para la especie de interés.

5.2 MODELO EXPERIMENTAL

Inicialmente, se seleccionó un diseño experimental (composición central), con el fin de determinar la secuencia de los experimentos a llevar a cabo, tanto para las fermentaciones en matraz como para aquellas en biorreactor.

Dado que se espera que la respuesta sea una curva y no una recta, se seleccionó un modelo de segundo orden de composición central. Se seleccionó un modelo factorial con las características antes mencionadas y con cuatro replicaciones en el centro. Estas cuatro replicaciones nos permiten, por medio del análisis de varianza (ANOVA) validar el modelo obtenido sin realizar repeticiones para cada punto experimental.

5.3 FERMENTACIONES EN MATRAZ

Se realizaron fermentaciones en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 200 mL de medio, y con una duración de 14 días, tomando muestras cada 24 horas y realizando determinación de glucosa residual, amonio residual, biomasa, pH y AG_3 . El medio (cuadro 3) fue ajustado a distintas concentraciones iniciales de glucosa (20, 24.4, 35, 45.6 y 50 g/L) y a distintas relaciones nitrógeno orgánico : nitrógeno inorgánico (0.25, 0.65, 0.625, 2.6 y 3).

La composición de cada medio (punto del modelo) se determinó en base al medio reportado por Álvarez y Molina (1), mostrado en el cuadro 3 y a la relación de fuente de nitrógeno orgánica (g de Agua de cocimiento de maíz, ACM) sobre fuente inorgánica (g de NH_4SO_3), así como a la concentración inicial de glucosa propuesta para cada experimento. Se empleó sulfato de amonio en lugar de nitrato de amonio. Las concentraciones correspondientes a cada valor de la relación N:N se muestran en la figura 2.

Cuadro 3: Medio empleado por Álvarez y Molina (1).		
Nutriente	<i>G. fujikuroi</i> NRRL 2278	<i>G. fujikuroi</i> NRRL 2284
Glucosa (g / L)	25	25
NH_4NO_3 (g / L)	0.3	0.1
KH_2PO_4 (g / L)	5	5
$MgSO_4$ (g / L)	1	1

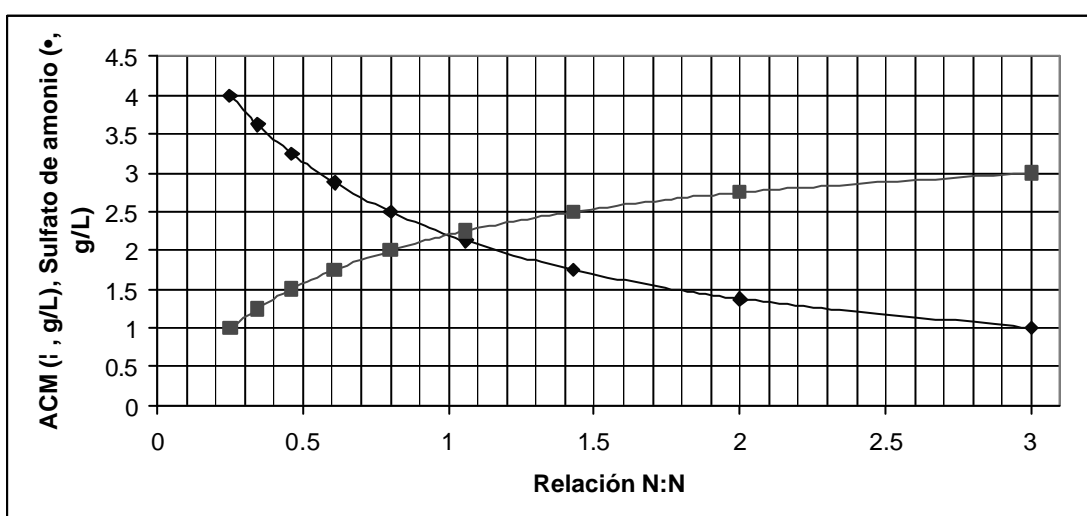


Figura No. 2: Concentraciones de las fuentes de nitrógeno fuente orgánica (ACM) / fuente inorgánica (Sulfato de amonio).

Para el cálculo de la relación N : N, se divide la concentración, en gramos por litro del ACM sobre la concentración en gramos por litro del sulfato de amonio. Las concentraciones se determinaron de manera tal que la suma de las concentraciones del ACM y del sulfato fuera aproximadamente igual para todos los experimentos (4 g/L). Esto con el fin de variar la relación entre ambas fuentes sin variar la concentración total de nitrógeno. Cabe aclarar que esto no es del todo exacto, ya que el ACM no contiene exclusivamente nitrógeno, y por tanto, aquellos experimentos con mayor cantidad de sulfato de amonio poseen mayor concentración de nitrógeno.

El objetivo de estas fermentaciones, además de determinar la concentración óptima de glucosa inicial y relación N : N fue determinar, de las dos cepas disponibles *Gibberella fujikuroi* NRRL 2278 y *Gibberella fujikuroi* NRRL 2284 a la mejor productora.

5.4 FERMENTACIONES EN BIORREACTOR.

Posteriormente, una vez seleccionada la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284 como la mejor productora se prosiguió a las fermentaciones en biorreactor, en las cuales se evaluó el efecto combinado de la potencia por unidad de volumen y la relación carbono nitrógeno. Para la relación carbono nitrógeno, consideramos gramos de glucosa sobre valor de la relación N:N.

Se siguió el mismo programa de muestreo que para las cinéticas en matraz, determinando del mismo modo, concentración de glucosa, amonio, AG_3 , y biomasa. La determinación de pH no fue realizada, ya que éste fue controlado a 4.5 por medio del sistema de control de pH del biorreactor. Se operó con una aereación de 1 vvm.

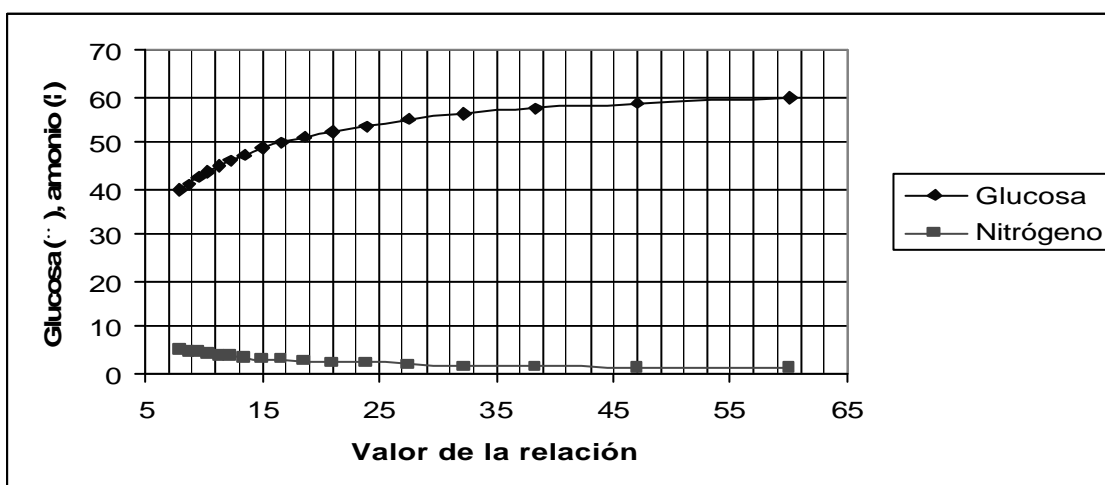


Figura No. 3: Valores de glucosa (♦) y amonio (¡) para la relación carbono nitrógeno.

5.5 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

Se llevó a cabo por medio de la técnica de Miller o del ácido 3,5-Dinitrosalicílico, basada en la cuantificación de grupos reductores hemiacetal. La cuál se describe a continuación:

A) Preparación del reactivo:

- Disolver 30g de tartrato de sodio y potasio en agua destilada.
- Adicionar 1.6g de NaOH previamente disueltos en agua.
- Adicionar 1g de DNS previamente disuelto en agua.
- Aforar la mezcla a 100 mL y homogenizar.
- Almacenar evitando exposición innecesaria a la luz.

B) Curva patrón:

- Preparar un estándar de glucosa 2 g/L en agua destilada.
- Realizar diluciones hasta 0.2 g/L por duplicado y tratarlas según la técnica del DNS.
- Preparar un blanco de agua.

C) Tratamiento de las muestras:

- Mezclar 0.1 mL de muestra con 0.9 mL de agua.
- Adicionar 1 mL del reactivo de DNS y homogenizar.
- Calentar en baño maría a ebullición durante exactamente 5 min.
- Enfriar a temperatura ambiente.
- Dejar reposar 15 min.
- Determinar absorbancia a 540 nm de luz visible contra un blanco de agua.

5.6 DETERMINACIÓN DE AMONIO

La determinación de amonio se llevó a cabo por medio de un electrodo especial para medir el ion amonio conectado a un multímetro capaz de adaptarse a este electrodo. La lectura se da en ppm.

5.7 DETERMINACIÓN DE BIOMASA

A) Peso seco en microcharola.

- Tomar 10 mL de caldo de fermentación.
- Centrifugar a 5000 rpm durante 10 min.
- Recuperar el sobrenadante para las determinaciones de AG_3 , glucosa, amonio y pH.
- Resuspender el precipitado en 1 mL de agua destilada.
- Colocar en una microcharola previamente pesada.

- Secar en horno a 60°C durante 48h.
- Pasar a desecador hasta alcanzar temperatura ambiente.
- Determinar el peso cuando éste sea constante.
- La cantidad de biomasa en los 10 mL de caldo es igual a la diferencia de peso de la charola con y sin biomasa.

B) Peso seco en membrana.

- Tomar 5 mL de caldo de fermentación.
- Filtrar a través de una membrana de nitrocelulosa con poro de 0.45 micras.
- Recuperar el filtrado para las determinaciones de AG₃, glucosa, amonio y pH.
- Colocar la membrana en una microcharola previamente pesada junto con la membrana antes del filtrado.
- Secar en horno a 60°C durante 48h.
- Pasar a desecador hasta alcanzar temperatura ambiente.
- Determinar el peso cuando éste sea constante.
- La cantidad de biomasa en los 5 mL de caldo es igual a la diferencia de peso de la charola y membrana con y sin biomasa.

5.8 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO

Para la cuantificación del ácido giberélico se optó por emplear la electroforesis capilar en lugar de reacciones colorimétricas o métodos espectrofotométricos directos. Se prefirió este método debido a que se considera mas preciso para la cuantificación de nuestro metabolito.

En base a experimentación y a la bibliografía (18), se determinó que las condiciones para la determinación del AG₃ a emplear son:

- Buffer boratos 100 mM.
- pH = 8.3
- Voltaje: 15kV, normal.
- Inyección de la muestra: 30 psig, 0.5 seg.
- Capilar: Normal.
- $\lambda = 200\text{nm}$.
- Condiciones de integración: ancho de banda = 0.1, umbral de detección = 250

Las muestras fueron previamente filtradas a través de membranas de nitrocelulosa de poro de 0.22 micras y sonicadas por 20 min antes de ser procesadas por el equipo.

6. RESULTADOS.

6.1 RECUPERACIÓN DE LA CEPA *Gibberella fujikuroi* NRRL 2284.

De acuerdo con la bibliografía, *Gibberella fujikuroi* es un hongo filamentoso que posee micelio septado, y produce ascosporas, lo cuál corresponde con las observaciones hechas al microscopio.

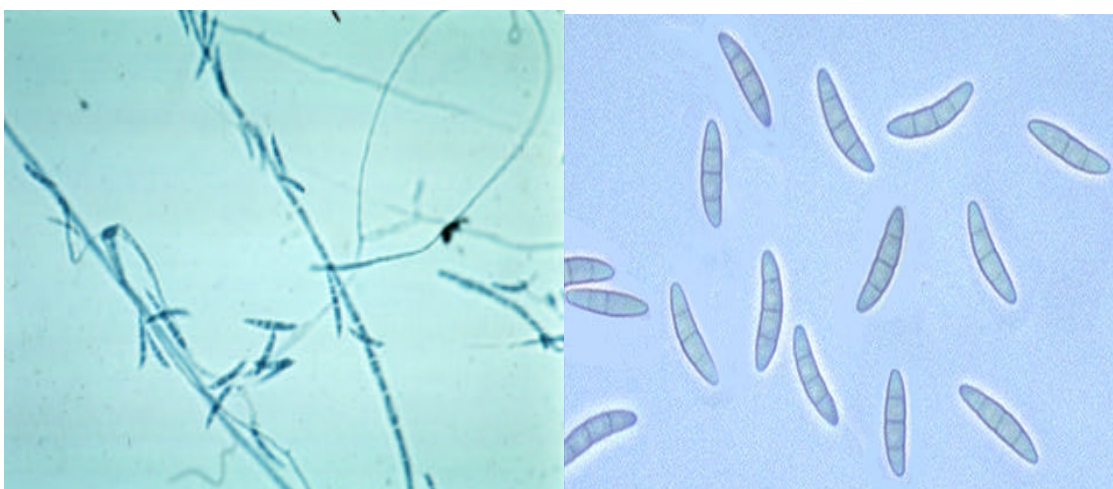


Figura No. 4: Micelio (izquierda) y ascosporas (derecha) de *Gibberella*

6.2 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO (AG₃) POR ELECTROFORESIS CAPILAR.

Bajo las condiciones estipuladas, se obtiene un tiempo de retención del ácido giberélico de aproximadamente 8 ± 0.1 minutos. Posteriormente, el equipo integra los electroferogramas, y por medio de la curva patrón, se transforma el área obtenida bajo el pico en la concentración en la muestra. En la figura 5 se muestra la curva de calibración obtenida

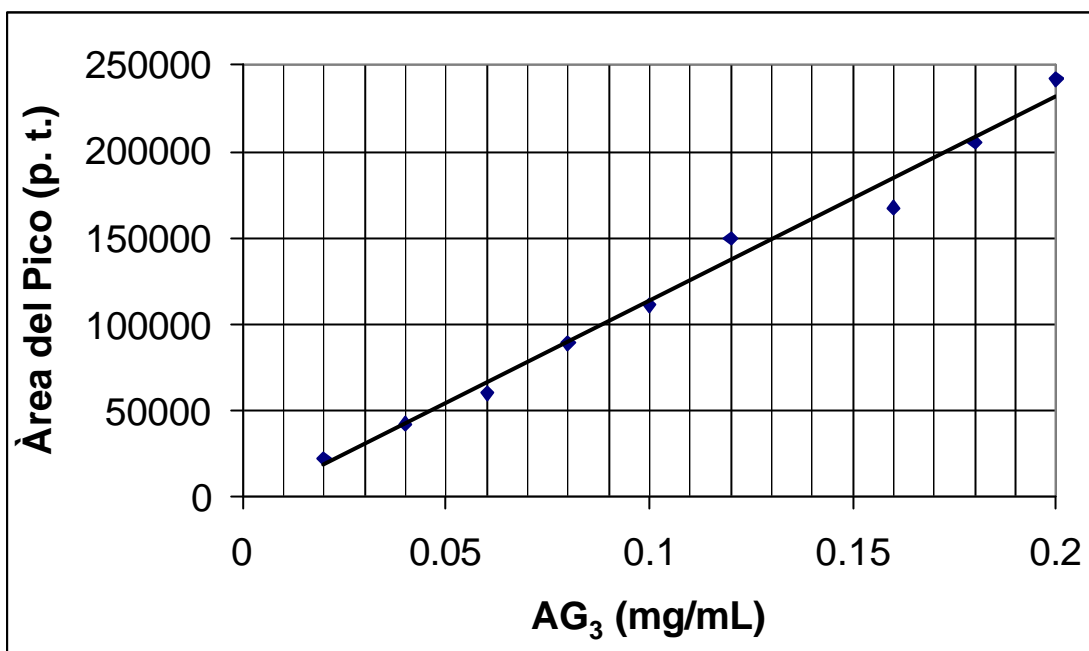


Figura No. 5: Curva patrón de AG₃ en electroforesis capilar (p. t. = platos teóricos).

6.3 SELECCIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

Dado que se espera que la respuesta sea una curva y no una recta (como sucede con frecuencia en los modelos biológicos, en los cuales la respuesta decrece al alejarse del punto óptimo), se seleccionó un modelo de segundo orden de composición central. Se seleccionó un modelo factorial con las características antes mencionadas y con cuatro repeticiones en el centro. En términos de las variables codificadas, el plano de estudio de las variables se muestra en la figura No.6.

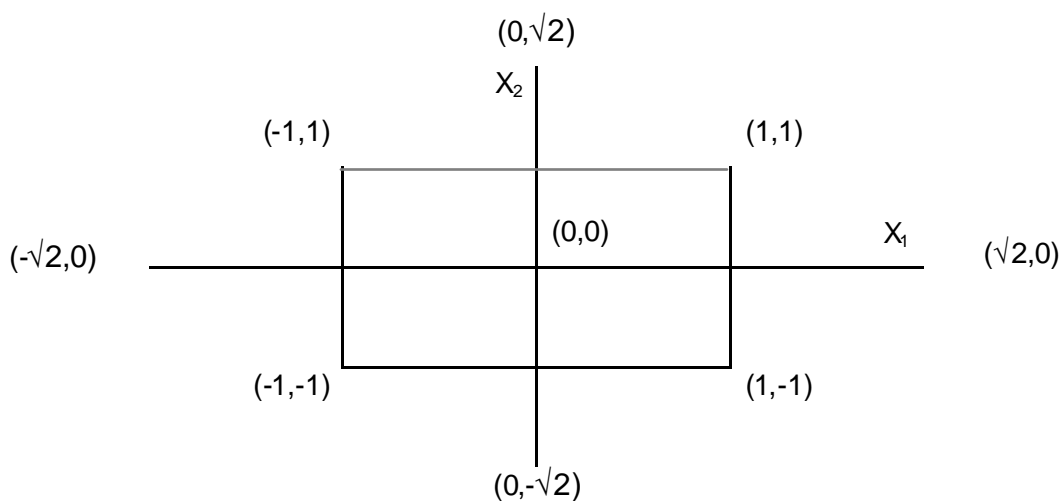


Figura No. 6: Área de experimentación en el plano de las variables X₁ y X₂

6.4 CODIFICACIÓN DE VARIABLES PARA LAS FERMENTACIONES EN MATRAZ.

En el cuadro 4 se presentan las variables que se estudiaron en las fermentaciones en matraz, es decir la relación entre fuente de nitrógeno inorgánico (sulfato de amonio) y agua de cocimiento de maíz (adimensional, X_1) y la concentración de glucosa (en g/L, X_2).

Cuadro 4: Codificación de las variables para la cinética de producción de AG₃ en matraz.

Número de experimento.	X_1 (Relación de Nitrógeno).		X_2 (Concentración de glucosa, g/L)	
	Codificada	Real	Codificada	Real
1	-1	0.65	-1	24.4
2	1	2.6	-1	24.4
3	-1	0.65	1	45.6
4	1	2.6	1	45.6
5	$-\sqrt{2}$	0.25	0	35
6	$\sqrt{2}$	3	0	35
7	0	1.625	$-\sqrt{2}$	20
8	0	1.625	$\sqrt{2}$	50
9	0	1.625	0	35
10	0	1.625	0	35
11	0	1.625	0	35
12	0	1.625	0	35

Bajo el esquema anterior se llevaron a cabo las cinéticas de producción en matraz con las cepas *Gibberella fujikuroi* NRRL2278 y *Gibberella fujikuroi* NRRL2284. En la figura 2, se muestran las concentraciones empleadas de cada una de las fuentes de nitrógeno en función del valor de la relación empleada.

6.5 CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN CON LA CEPA *Gibberella fujikuroi* NRRL 2278.

En las figuras 7A y 7B se presenta un ejemplo de las cinéticas llevadas a cabo en matraz con la cepa *Gibberella fujikuroi* NRRL2278 (el resto se encuentra en el Anexo I), así como las concentraciones finales de ácido giberélico en cada una de las cinéticas.

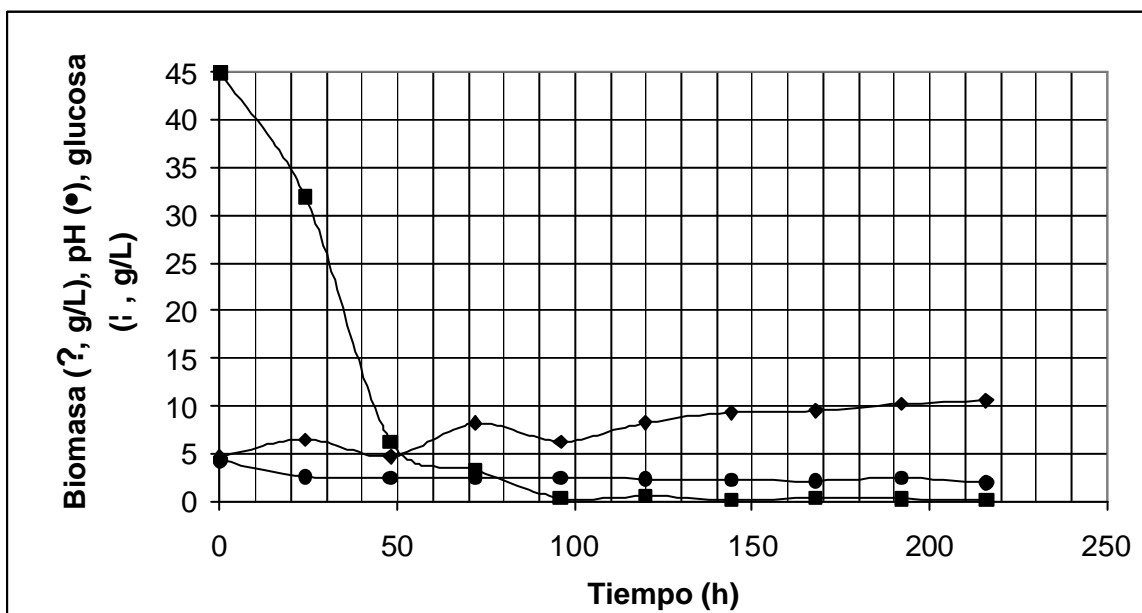


Figura No. 7.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matraz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 5, valores de biomasa, pH y glucosa.

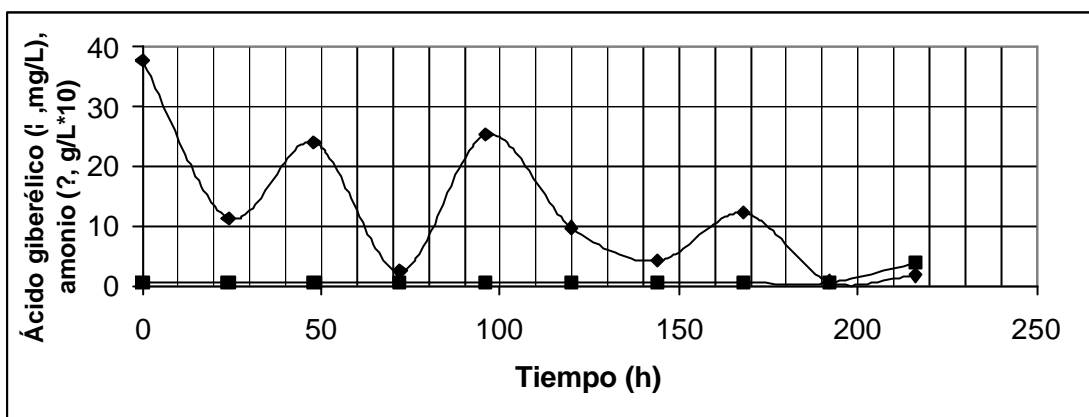


Figura No. 7.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 5, valores de Ácido giberélico y amonio.

Cuadro 5: Concentraciones finales de ácido giberélico AG ₃ en matríz por <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2278.	
Número de Experimento.	AG3 (mg/mL)
1	0.0058275
2	0.0140705
3	0.0333615
4	0.0064535
5	0.0382055
6	0.0061535
7	0.0063515
8	0.0057755
9	0.0057755
10	0.0058735
11	0.0059325
12	0.0062185

Con los datos de la tabla anterior, se obtuvo el siguiente modelo:

a) Para las variables codificadas:

$$y = 3.539 - 0.512X_1 + 0.153X_2 + 3.237X_1^2 + 2.721X_2^2 - 0.141X_1X_2$$

b) Para las variables sin codificar:

$$y = 3.1 \times 10^6 + 4.96 \times 10^6 X_1 + 1.191 \times 10^8 X_2 + 9.96 \times 10^6 X_1^2 + 4.8 \times 10^9 X_2^2 + 1.9 \times 10^8 X_1 X_2$$

Del modelo de variables codificadas, se obtiene la superficie de respuesta, que vista superiormente produce la gráfica de contornos. Ambas se muestran en la Figura 8.

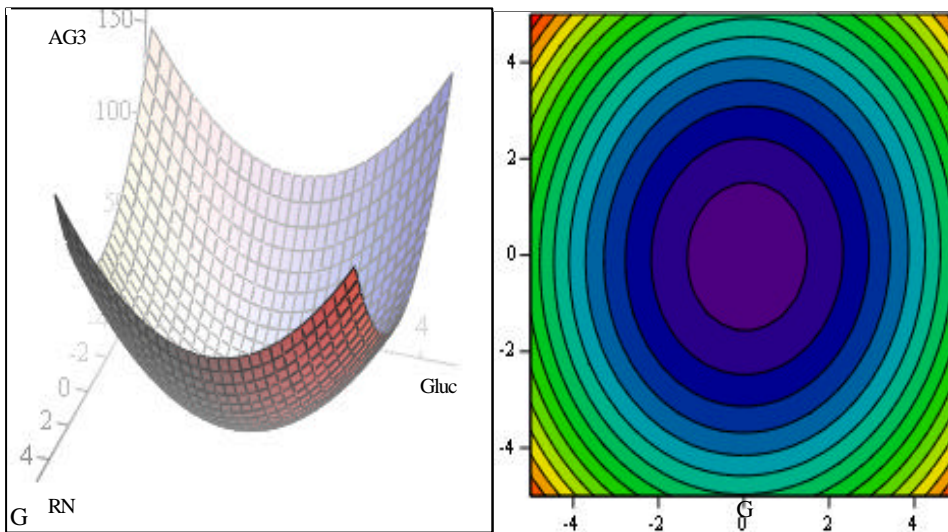


Figura No. 8: Superficie de respuesta (izquierda) y gráfica de contornos (derecha) para la estimación de la producción de AG₃ por *G. fujikuroi* NRRL 2278 en matraz. RN = Relación de nitrógeno (adimensional, codificada); Gluc = Concentración de glucosa (g/L, codificada); AG₃ = Ácido giberélico (mg/mL).

Y si se enfoca en el área experimental de las variables de regresión:

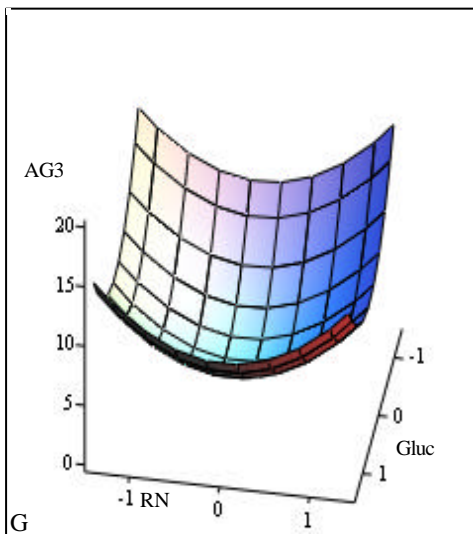


Figura No. 9: Superficie de respuesta de la zona experimental para la estimación de la producción de AG₃ por *G. fujikuroi* NRRL 2278 en matraz.

Para evaluar la significancia estadística los datos obtenidos de estas fermentaciones, se sometieron a la prueba de ANOVA. Los resultados de este análisis se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6: Análisis de varianza para la producción de ácido giberélico en matraz con <i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL 2278.					
Fuente de Variación	Suma de cuadrados.	Grados de libertad	Cuadrados medios.	Fo (calculada)	Fo (de tablas)
Regresión.	1.243	2	0.622	-4.509	58.86
Residual	-1.242	9	-0.138		
Total.	0.001467	11			

Por lo tanto, aceptamos H_0 , y rechazamos que al menos alguna de las variables tiene un efecto sobre la variable respuesta para el intervalo de confianza de 95%.

6.6 CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN CON LA CEPA *Gibberella fujikuroi* NRRL 2284.

En las figuras 10A y 10B se presenta un ejemplo de las cinéticas llevadas a cabo en matraz con la cepa *Gibberella fujikuroi* NRRL2284 (el resto se encuentra en el Anexo I), así como las concentraciones finales de ácido giberélico en cada una de las cinéticas. En el cuadro 7 se muestran las concentraciones de AG₃ obtenidas en cada una de las fermentaciones.

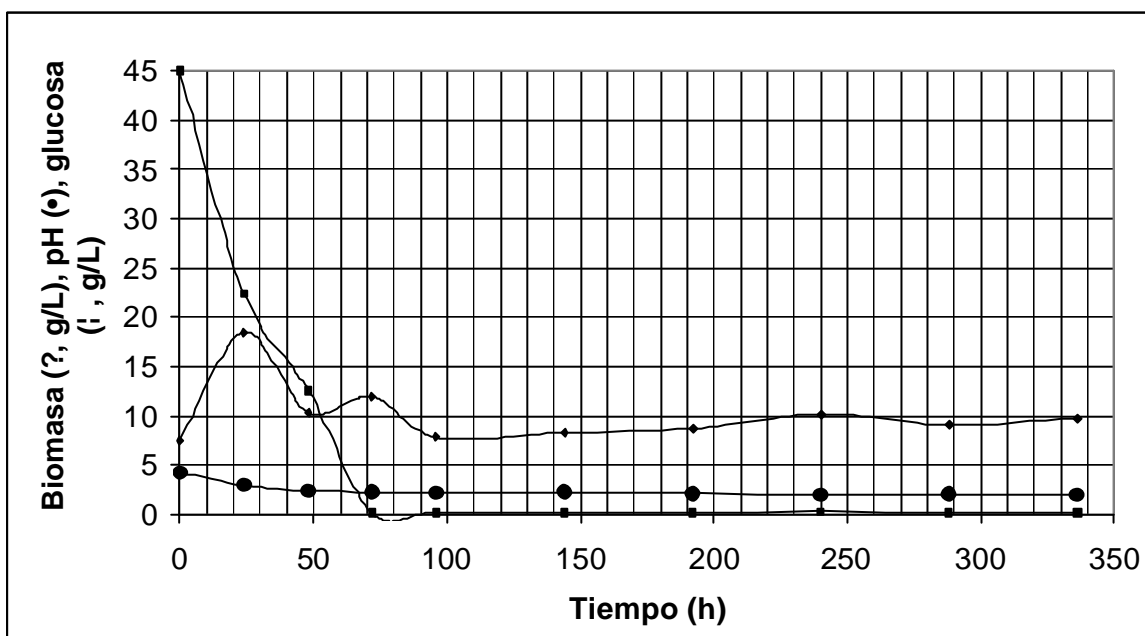


Figura No. 10.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matraz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 5, valores de biomasa, pH y glucosa.

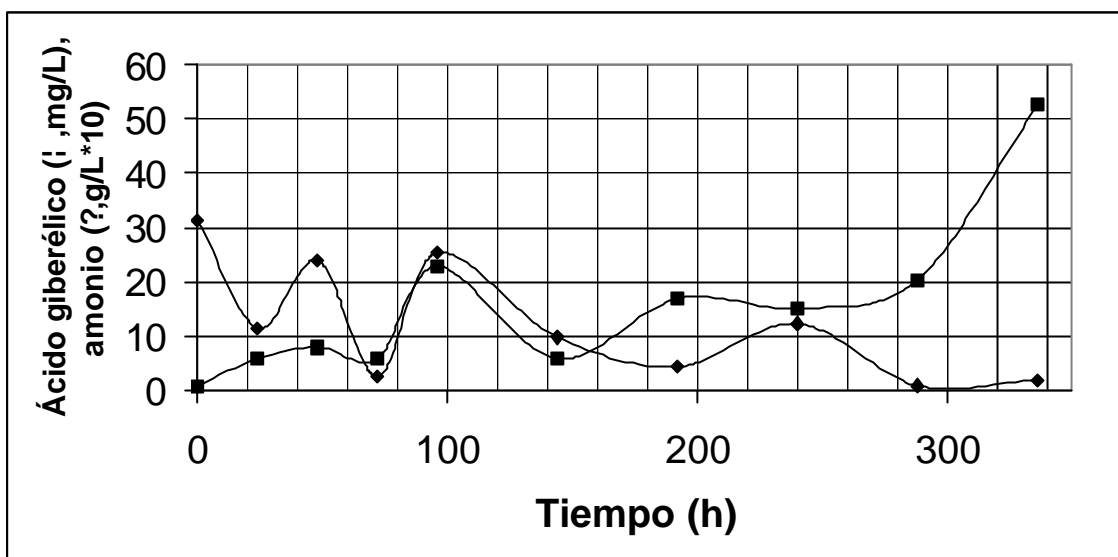


Figura No. 10.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 5, valores de Ácido giberélico y amonio.

Número de Experimento.	AG3 (mg/mL)
1	0.021
2	0.03
3	0.025
4	0.0065
5	0.052
6	0.07
7	0.022
8	0.018
9	0.0073
10	0.023
11	0.013
12	0.01

Con los datos de la tabla anterior, se obtuvo el siguiente modelo:

c) Para las variables codificadas:

$$y = 0.064 - 0.063 X_1 + 0.00057 X_2 + 0.02 X_1^2 - 0.000012 X_2^2 - 0.00011 X_1 X_2$$

d) Para las variables sin codificar:

$$y = 7.484 + 0.127 X_1 - 0.202 X_2 + 6.949 X_1^2 + 5.637 X_2^2 - 0.11 X_1 X_2$$

Del modelo de variables codificadas, se obtiene la superficie de respuesta, que vista superiormente produce la gráfica de contornos. Ambas se muestran en la Figura 11.

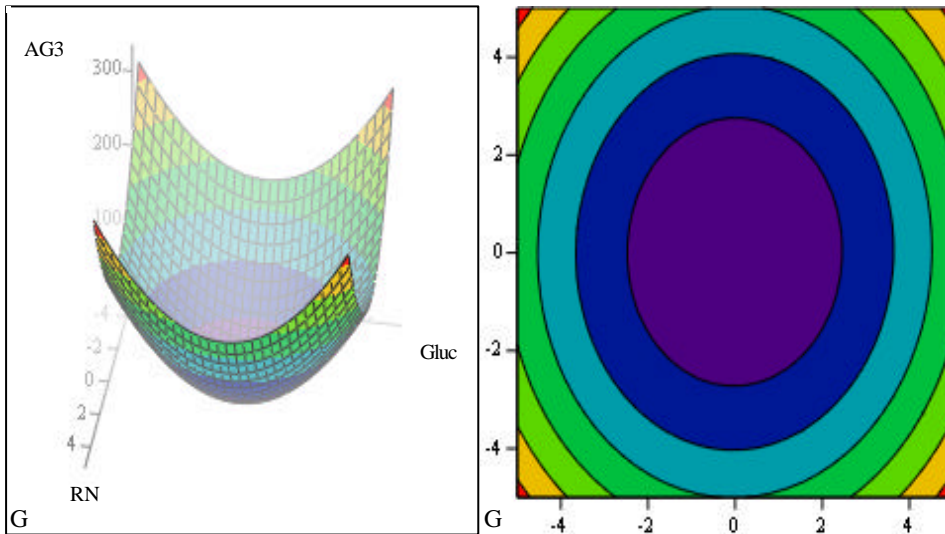


Figura No. 11: Superficie de respuesta (izquierda) y gráfica de contornos (derecha) para la estimación de la producción de AG₃ por *G. fujikuroi* NRRL 2284 en matraz.

Y si se enfoca en el área experimental de las variables de regresión:

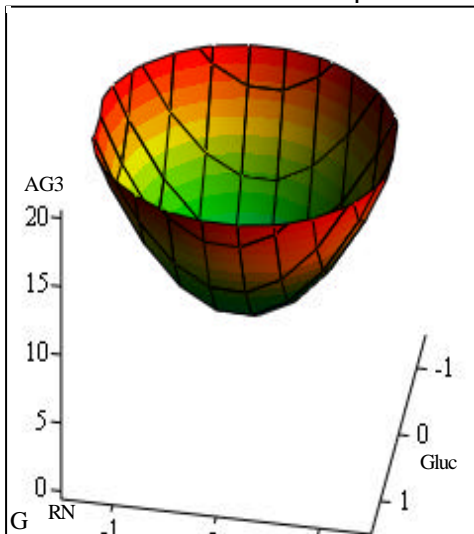


Figura No. 12: Superficie de respuesta de la zona experimental para la estimación de la producción de AG₃ por *G. fujikuroi* NRRL 2284 en matraz.

Para evaluar la significancia estadística los datos obtenidos de estas fermentaciones, se sometieron a la prueba de ANOVA. Los resultados de este análisis se presentan en el cuadro 8.

Cuadro 8: Análisis de varianza para la producción de ácido giberélico en matraz con <i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL 2284.					
Fuente de Variación	Suma de cuadrados.	Grados de libertad	Cuadrados medios.	Fo (calculada)	Fo (de tablas)
Regresión.	2.69×10^{-3}	2	1.345×10^{-3}	10.15	58.86
Residual	1.193×10^{-3}	9	1.325×10^{-4}		
Total.	3.88×10^{-3}	11			

Por lo tanto, aceptamos H_0 , y rechazamos que al menos alguna de las variables tiene un efecto sobre la variable respuesta en un intervalo de confianza del 99%.

6.7 CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN EN BIORREACTOR

Para las cinéticas en biorreactor, dado que fue la cepa que produjo las mayores concentraciones de AG_3 , se empleó la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, evaluando la interacción de la velocidad de agitación y la relación carbono / nitrógeno. El modelo empleado fue el mismo utilizado para las fermentaciones en matraz, cambiando únicamente las variables bajo estudio. Los valores empleados para la relación carbono / nitrógeno se encuentran en la figura 3.

Posteriormente, se procedió a realizar las fermentaciones, empleando como puntos experimentales los valores mostrados en el cuadro 9.

Cuadro 9: Codificación de las variables para la cinética de producción de AG_3 en biorreactor.				
Número de experimento.	X_1 (Relación Carbono Nitrógeno).		X_2 (P/V, kW/m ³)	
	Codificada	Real	Codificada	Real
1	-1	15.62	-1	14.96
2	1	52.38	-1	14.96
3	-1	15.62	1	276.79
4	1	52.38	1	276.79
5	$-\sqrt{2}$	8	0	92.07
6	$\sqrt{2}$	60	0	92.07
7	0	34	$-\sqrt{2}$	4.02
8	0	34	$\sqrt{2}$	394.81
9	0	34	0	92.07
10	0	34	0	92.07
11	0	34	0	92.07
12	0	34	0	92.07

En las figuras 13A y 13B se presenta un ejemplo de las cinéticas llevadas a cabo en biorreactor con la cepa *Gibberella fujikuroi* NRRL2284 (el resto se encuentra en el Anexo I), así como las concentraciones finales de ácido giberélico en cada una de las cinéticas. N el cuadro 10, se muestran las concentraciones finales de AG_3 obtenidas en las fermentaciones en biorreactor.

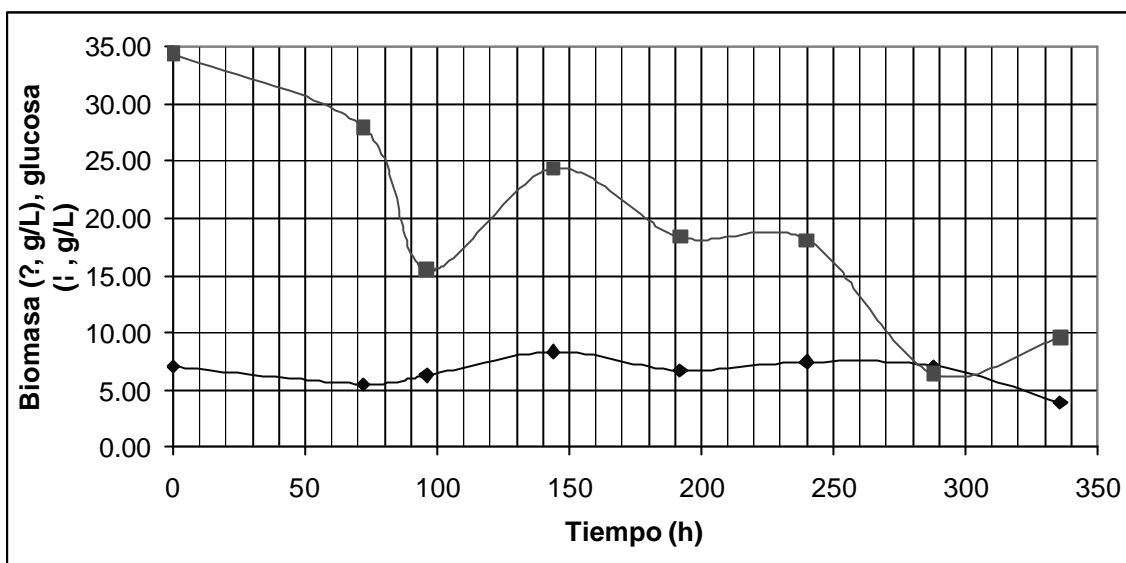


Figura No. 13.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en biorreactor con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 12, valores de biomasa y glucosa.

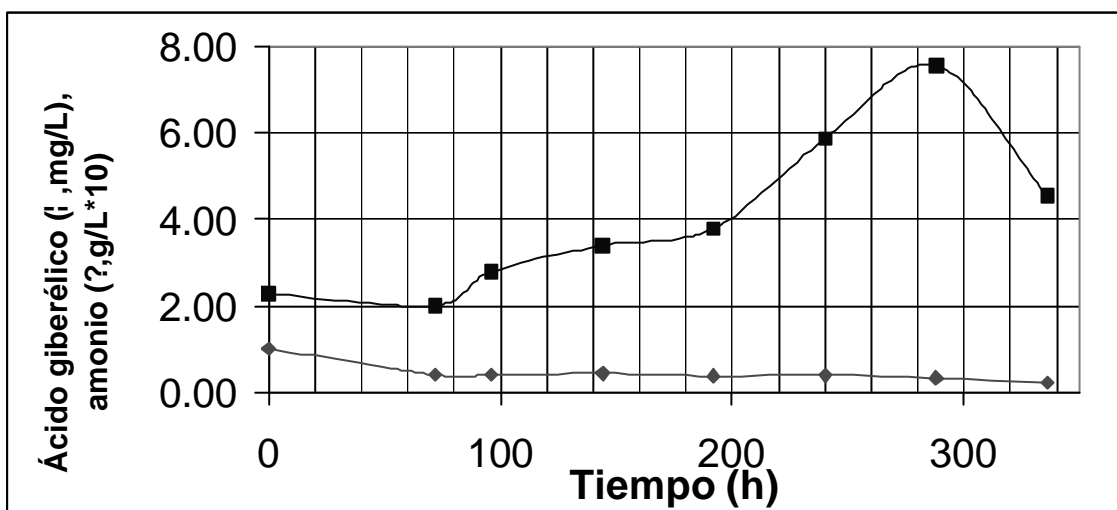


Figura No. 13.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 12, valores de ácido giberélico y amonio.

Número de Experimento.	AG3 (mg/mL)
1	0.7838
2	0.5785
3	0.2191
4	0.1277
5	0.6178
6	0.1626
7	0.0741
8	0.1725
9	0.1034
10	0.1069
11	0.1086
12	0.0792

Con los datos del cuadro anterior, se obtuvo el siguiente modelo:

e) Para las variables codificadas:

$$y = 0.103 - 0.115X_1 - 0.107X_2 + 0.185X_1^2 + 0.052X_2^2 + 0.023X_1X_2$$

f) Para las variables sin codificar:

$$y = 1.539 - 0.047 X_1 - 0.0027 X_2 + 0.00055 X_1^2 + 0.0000026 X_2^2 - 0.000011 X_1X_2$$

Del modelo de variables codificadas, se obtiene la superficie de respuesta, que vista superiormente produce la gráfica de contornos. Ambas se muestran en la Figura 14.

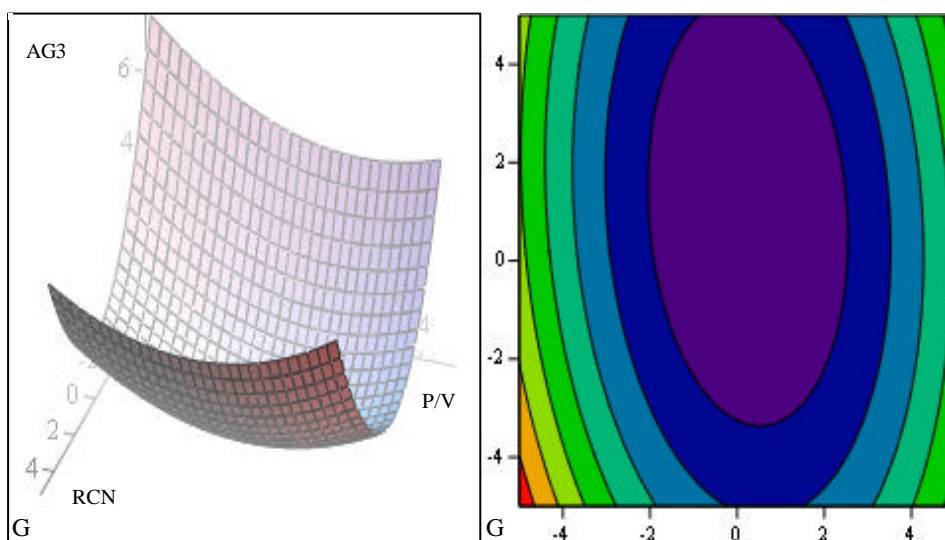


Figura No. 14: Superficie de respuesta (izquierda) y gráfica de contornos (derecha) para la estimación de la producción de AG_3 por *G. fujikuroi* NRRL 2284 en biorreactor.

Para evaluar la significancia estadística los datos obtenidos de estas fermentaciones, se sometieron a la prueba de ANOVA. Los resultados de este análisis se presentan en el cuadro 11.

Cuadro 11: Análisis de varianza para la producción de ácido giberélico en biorreactor con <i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL 2284.					
Fuente de Variación	Suma de cuadrados.	Grados de libertad	Cuadrados medios.	Fo (calculada)	Fo (de tablas 90%)
Regresión.	0.42	2	0.21	8.121	4.16
Residual	0.233	9	0.026		
Total.	0.653	11			

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

7.1 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO.

La técnica para la cuantificación del ácido giberélico en el medio fue parcialmente obtenida de la bibliografía (18) y parcialmente desarrollada en el laboratorio. De la bibliografía se tomó la separación por voltaje y el buffer de borato. Sin embargo, en lugar de emplear buffer de bórax (tetraborato de sodio) y SDS, se empleó buffer boratos 100mM (de bórax y ácido bórico), ya que con ese buffer se cuenta comercialmente. La longitud de onda (200nm) fue seleccionada ya que un barrido de luz UV demostró que la absorbancia es mayor conforme se disminuye la longitud de onda. La inyección de la muestra se tomó basada en otro método empleado en el equipo, y el tipo de capilar (en nuestro caso neutro) se elige en base a la estructura del compuesto a separar.

7.2 MODELO EXPERIMENTAL.

El modelo de segundo orden de composición central fue seleccionado debido a que se esperaba trabajar en una región cercana o que incluyera el nivel óptimo de la variable de respuesta. Debido a que los procesos biológicos tienen un incremento en la respuesta conforme se acerca hacia el punto óptimo, y posteriormente un decremento respecto a la máxima respuesta conforme se aleja de éste, el modelo de segundo orden resulta adecuado a nuestros fines. Esto fue claramente visible en las superficies obtenidas (figuras 8 y 11).

7.3 CINÉTICAS EN MATRAZ

Existen dos razones principales por las cuáles las concentraciones obtenidas de ácido giberélico fueron considerablemente bajas. La primera de ellas es el pH; ya que la mayor producción de ácido giberélico se obtiene en un intervalo de pH de 3.5 a 5.5, y debido a que el pH descendió hasta 2.6 en prácticamente todos los casos, se observa una baja producción de AG₃. La segunda razón fue el tiempo, ya que como se observa en la figura 5, es hasta el octavo día que se observa una presencia casi nula del amonio, condición indispensable para la producción del ácido giberélico, lo que nos indica que es necesario incrementar la duración de las cinéticas. Lo anterior no fue realizado durante el desarrollo de las cinéticas debido a que no se contaba aún con la técnica para la determinación del producto, por lo que se tomaron y almacenaron en congelación muestras libres de biomasa, que fueron posteriormente tratadas (filtradas y sometidas a electroforesis capilar). Hay que mencionar que el hecho de observar la mayor producción de AG₃ en el

punto con menor cantidad de nitrógeno no implica que éste sea el punto óptimo, sino que al ser el medio con menor cantidad de nitrógeno, este es agotado antes que en los demás medios, y por tanto la producción de ácido giberélico comienza antes; sin embargo, para determinar el punto óptimo, fue necesario evaluar las cinéticas tras un mayor tiempo, incrementando la duración de las cinéticas de 9 a 14 días.

Con la cepa de *G. fujikuroi* NRRL2284 (puesto que produjo las mayores concentraciones de AG₃) se incrementó la duración de las cinéticas, y aún cuando los niveles de producción de AG₃ sí fueron mayores, no fueron los deseados, por lo que otra hipótesis para los bajos niveles es la baja o casi nula concentración de glucosa en el medio al comenzar la etapa de limitación de nitrógeno. Sin embargo, dado que nuestra intención durante las cinéticas en matraz fue principalmente seleccionar a la mejor cepa, se optó por proseguir con las cinéticas en biorreactor con la cepa NRRL 2284, y no optimizar desde el nivel de matraz. En cuanto a las superficies de respuesta, se puede observar claramente (figuras 8,9, 11 y 12) que ambas variables de regresión generan un comportamiento de segundo orden en la variable de respuesta, tal como se esperaba.

El análisis de varianza nos conduce a aceptar la hipótesis nula, y negar que alguna de las variables de regresión tenga algún efecto sobre el comportamiento de la variable de respuesta. Sin embargo, al prolongar el tiempo de las cinéticas, se observó que si bien, aún se acepta Ho, si se reduce el intervalo de confianza de 95% a 90%, es posible rechazar Ho, y por tanto concluir que al menos una de las variables produce algún efecto sobre la variable de respuesta. Aun cuando no se obtuvieron los niveles de producción deseados, es importante realizar el ANOVA para asegurar que los resultados obtenidos son estadísticamente confiables y por tanto pueden ser utilizados para la selección de la cepa.

7.4 CINÉTICAS EN BIORREACTOR.

En las cinéticas en biorreactor, en prácticamente todos los casos la fase de limitación por nitrógeno se presenta en los primeros días de la fermentación. Debido a esto, en todas las fermentaciones el incremento en la biomasa fue mínimo y, en los casos en que se presenta, de tendencia lineal. El pH, fue controlado a un valor constante de 5.

Se presentaron mayores concentraciones de glucosa residual que en las fermentaciones en matraz. Debido probablemente a llegar, en la mayoría de los casos, pasadas apenas 24 horas a la fase estacionaria debido a la limitación por nitrógeno. El

incremento en la concentración de glucosa al tiempo uno (en los casos que se presenta) puede deberse a un error de medición por mal pipeteo.

El ácido giberélico (AG_3) es producido en todas las fermentaciones. Debemos recordar que se emplearon dos diferentes fuentes de nitrógeno: el sulfato de amonio y el Agua de Cocimiento de Maíz (ACM). La importancia de este diferente empleo de dos fuentes de nitrógeno radica en que, mientras que el sulfato de amonio es una sal, y por tanto de rápida asimilación y metabolismo, el ACM debe ser primero catabolizada para poder ser utilizada para el metabolismo, y por tanto su uso es más lento. Es decir, una vez consumida, el ACM constituye una forma de reserva de nitrógeno hasta ser transformada en una forma utilizable por el microorganismo.

Probablemente a esto se deba el diferente tiempo de aparición del ácido giberélico en cada una de las fermentaciones. Mientras que en aquellas en las que el sulfato de amonio es la principal fuente de nitrógeno el AG_3 aparece poco después de iniciada la fase estacionaria por agotamiento de nitrógeno, en aquellas con ACM como principal fuente de nitrógeno la aparición del AG_3 se observa más hacia el final de la fermentación.

Como se puede observar, al final de la fermentación se observa que en todos los casos la glucosa prácticamente se agota. A esto se debe el hecho de la desaparición del AG_3 tras llegar a su punto máximo. Pues al agotarse la fuente de carbono, el microorganismo recurre a algunos de los metabolitos secundarios producidos previamente como fuentes de carbono alternativas. A pesar de esto, se logró obtener una producción de 0.78 g/L de AG_3 . A nivel industrial se han alcanzado producciones de hasta 8 g/L empleando cepas genéticamente modificadas y 1.2 g/L con cepas silvestres. Dentro de UPIBI, la concentración máxima anteriormente alcanzada fue de 0.6 g/L (1).

En la superficie de respuesta, podemos observar que nuevamente no se encontró la tendencia esperada (Figura 14). Esperábamos un comportamiento parabólico en el cual el vértice indicara el punto óptimo, y en nuestro caso, el vértice corresponde al punto mínimo. Se observa también que una de las variables (Relación C:N) tiene mayor efecto sobre la producción del AG_3 . De acuerdo con el valor F_0 arrojado por el ANOVA, podemos rechazar la hipótesis nula para un intervalo de confianza del 90%, asegurando que al menos una de las variables tiene efecto sobre la producción del AG_3 . Esto implica una probabilidad del 90% de que los resultados predichos por el modelo sean certeros.

8. CONCLUSIONES.

CINÉTICAS EN MATRAZ

- La producción de ácido giberélico se incrementó 0.038 mg/mL, bajo las condiciones de estudio, al prolongar la duración de la fermentación de 9 a 14 días.
- La cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284 produjo mayor concentración de ácido giberélico (0.014 mg/mL más que la otra cepa) en fermentación sumergida, por lo que fue seleccionada para las fermentaciones en biorreactor.
- Fueron elaborados modelos matemáticos (regresión lineal múltiple) para la producción de ácido giberélico, evaluando la concentración inicial de la fuente de carbono (glucosa) y la relación entre nitrógeno orgánico : inorgánico a partir de las superficies de respuesta.
- Ninguna de las variables tiene efecto estadísticamente significativo sobre la producción de ácido giberélico para un intervalo de confianza del 95%.
- Mientras que la Hipótesis nula se acepta para cualquier intervalo de confianza para la cepa NRRL 2278, para la cepa NRRL 2284 se rechaza para un intervalo de confianza del 85%, indicando que al menos alguna de las variables tiene algún efecto sobre la producción del ácido giberélico.

CINÉTICAS EN BIORREACTOR

- La producción de ácido giberélico (0.78 g/L) se incrementó con respecto a la producción anteriormente obtenida de 0.6 g/L en la UPIBI (Álvarez y Molina, 1).
- Fue desarrollado un modelo para la producción de ácido giberélico evaluando la velocidad de agitación y la relación entre nitrógeno orgánico : inorgánico a partir de las superficies de respuesta.
- La hipótesis nula fue rechazada para un intervalo de confianza del 85%, indicando que al menos una de las variables tiene efecto sobre la producción de ácido giberélico.

9. PERSPECTIVAS.

Probar un modelo de fermentación en continuo o en lote alimentado para subsanar la baja producción del ácido giberélico debido a las concentraciones de nitrógeno y glucosa durante la fase de producción.

También se tiene contemplado evaluar los datos obtenidos mediante un diseño factorial, tan pronto se halle un medio factible para esto.

Será conveniente controlar el pH en fermentaciones en matraz para mantenerlo en el intervalo recomendado por la bibliografía, y observar si esto mejora los niveles de producción.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. ÁLVAREZ LUCIO, Maximino y MOLINA JIMÉNEZ, Héctor; “Producción de ácido Giberélico con células inmovilizadas de *Gibberella fujikuroi*”; Informe Técnico final, UPIBI, IPN, México D. F. 2002.
2. BORROW, A.; BROWN, Sheila; JEFFERYS, E. G.; KESSELL, R. H. J.; LLOYD, Eithne C.; LLOYD, P. B.; ROTHWELL, A.; ROTHWELL, B. Y J. C. SWAIT.; “The effect of varied temperature on the kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture”; Canadian Journal of Microbiology, Vol. 10, pp. 445-466, 1964.
3. BORROW, A.; BROWN, Sheila; JEFFERYS, E. G.; KESSELL, R. H. J.; LLOYD, Eithne C.; LLOYD, P. B.; ROTHWELL, A.; ROTHWELL, B. Y J. C. SWAIT.; “The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture”; Canadian Journal of Microbiology, Vol. 10, pp. 407-444, 1964.
4. BORROW, A.; BROWN, Sheila; JEFFERYS, E. G.; KESSELL, R. H. J.; LLOYD, Eithne C.; LLOYD, P. B. Y NIXON, I. S.; “The metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture”; Canadian Journal of Microbiology, Vol. 7, 1961.
5. BRÜCKNER, B. Y BLECHSCHMIDT, D.; “Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*”; Applied Microbiology and Biotechnology, No. 35; Springer –Verlag, 1991.
6. BRÜCKNER, Bettina and BLECHSCHMIDT, Dieter; “The Gibberellin fermentation”; Critical Reviews in Biotechnology, No. 11, Vol2, 1991.
7. BU’LOCK. J. D.; DETROY, R. W.; HOSTÁLEK, Z. Y MUNIM-AL-SHAKARCHI, Abdul; “Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*”; Transactions British Mycological Society, No 62, Vol. 2, Gran Bretaña, 1974.
8. ESCAMILLA S., Eleazar M; DENDOOVEN, Luc; MAGAÑA P., IGNACIO; Parra S.,R.; DE LA TORRE, M.; “Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors”; Journal of Biotechnology No. 76; Elsevier publications, 2000.
9. GARCÍA SALAS, Sergio; ORDAZ CONTRERAS, Leobardo; OROZCO ÁLVAREZ, Carlos; “Ingeniería de Fermentaciones”; UPIBI, IPN, México, D. F., 1999.
10. GONZÁLEZ, P., C.; DELGADO, G.; ANTIGUA, M.; RODRÍGUEZ, J.; LARRALDE, P.; VINIEGRA, G.; POZO, L. y PÉREZ M. Del C; “Some aspects of *Gibberella fujikuroi* culture concerning Gibberellic Acid Production”; Advances in Bioprocess Engineering; Editores: Galindo, Enrique y Ramírez T. Octavio; Kluluen Academic Publishers; Dordrecht, Boston, Londres, 1994.

11. JEFFERYS, E. G.; "The Gibberellin fermentation"; Advances Applied Microbiology, Vol. 13, 1971.
12. KHURI, André I.; "Response surfaces"; Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 1987.
13. KONEMAN, Elmer; ALLEN, Stephen; DOWELL, V. R.; JANDA, William; SOMMER, WINN, Washington; "Diagnóstico microbiológico; Texto y Atlas a color"; Editorial Panamericana, Tercera Edición; Buenos Aires, Argentina, 1992.
14. KUMAR, P. K. R. y LONSANE, B. K.; "Microbial production of Gibberellins: State of the Art"; Advances in Applied Microbiology, Vol. 34, 1989
15. REYES, Candau; AVALOS, Javier and CERDÁ, Olmedo; "Regulation of Gibberellin Biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*"; Plant Physiology No. 100, 1992.
16. VOGEL, C. Henry; TODARO, L. Celeste; "Fermentation and Biochemical engineering Handbook, Principles, process design and equipment"; Second edition, Noyes publications, New Jersey, USA, 1997.
17. ODUM, Eugene P.; "Ecología"; Nueva Editorial Interamericana, Tercera Edición, México, D. F., 1972.
18. BI-FENG LIU, XUE-HA ZHONG & YING-TANG LU; "Analysis of plant hormones in tobacco flowers by micellar electrokinetic capillary chromatography coupled with on-line large volume sample stacking"; Journal of chromatography A, No. 945, 2002 pp. 257-265.
19. TAKAHASI, NOBUTAKA (Editor); "Chemistry of plant hormones" CRC Press, Inc., 1986.

ANEXO I (GRÁFICAS)

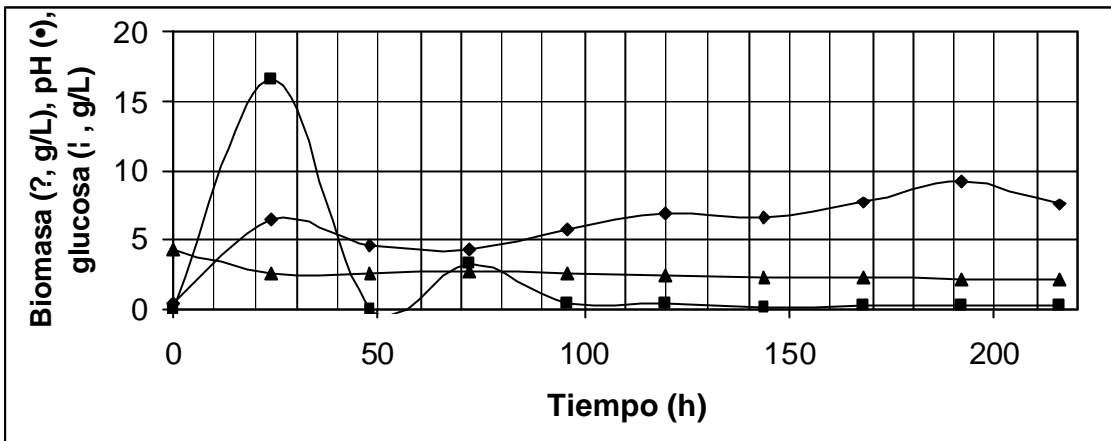


Figura No. 15.A: Cinética de producción de  cido Giberélico en matr z con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 1, valores de biomasa, pH y glucosa.

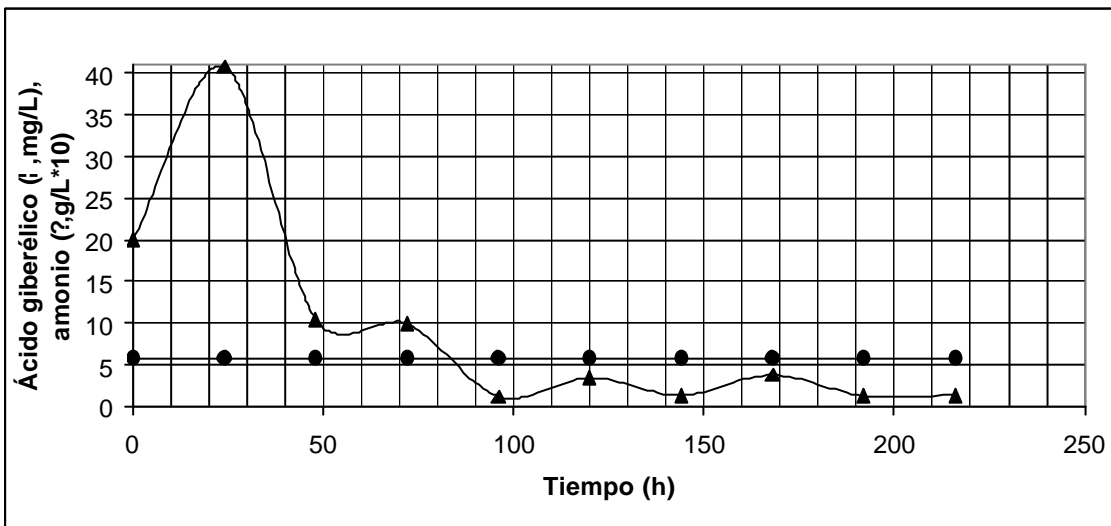


Figura No. 15.B: Cinética de producción de  cido Giberélico en matr z con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 1, valores de ácido giberélico y amonio.

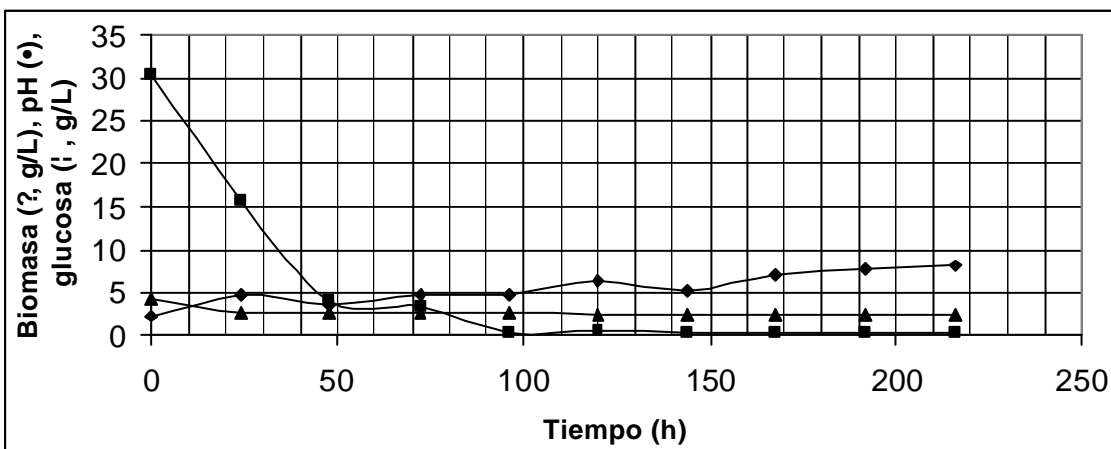


Figura No. 16.A: Cinética de producción de  cido Giberélico en matr z con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 2, valores de biomasa, pH y glucosa.

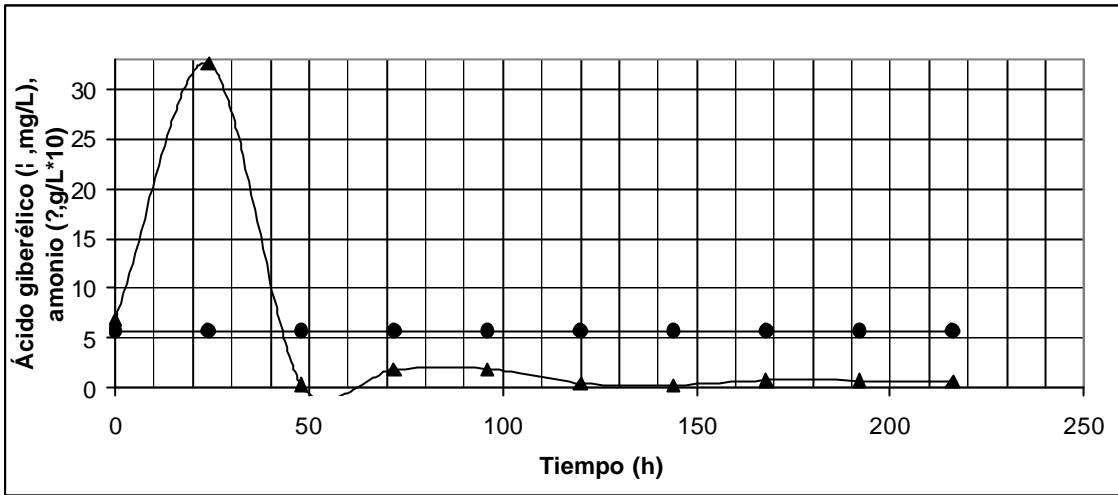


Figura No. 16.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 2, valores de ácido giberélico y amonio.

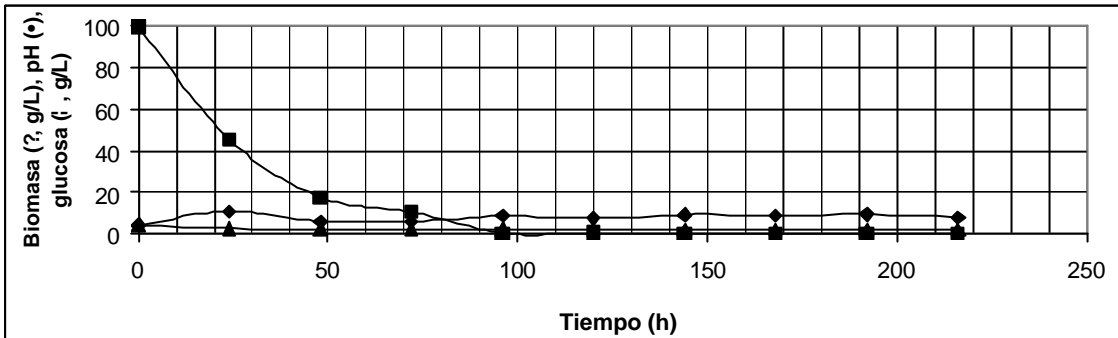


Figura No. 17.A: Cinética de producción de  cido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 3, valores de biomasa, pH y glucosa.

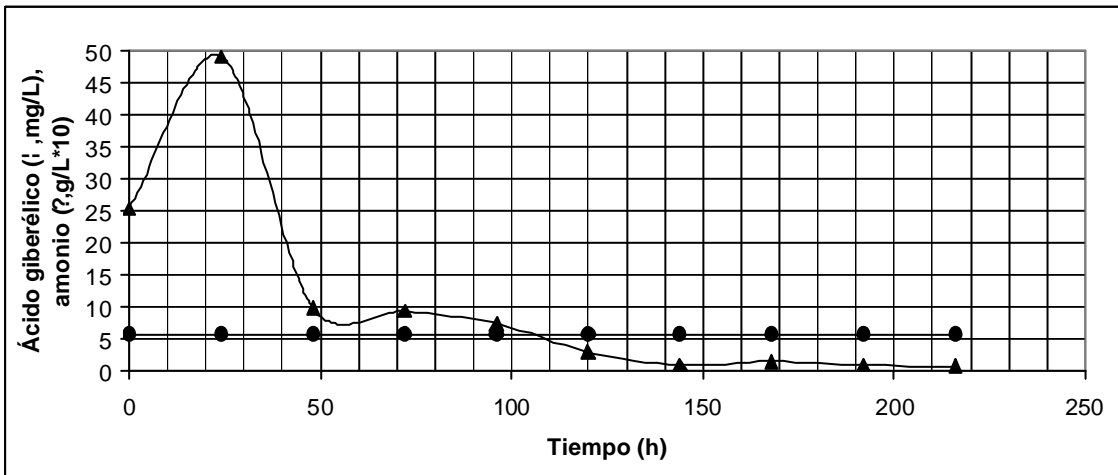


Figura No. 17.B: Cinética de producción de  cido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 3, valores de ácido giberélico y amonio.

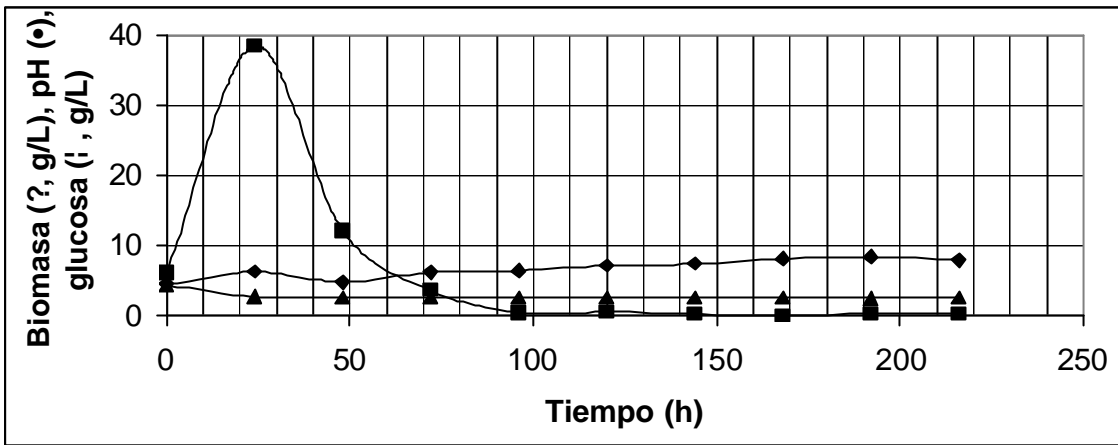


Figura No. 18.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 4, valores de biomasa, pH y glucosa.

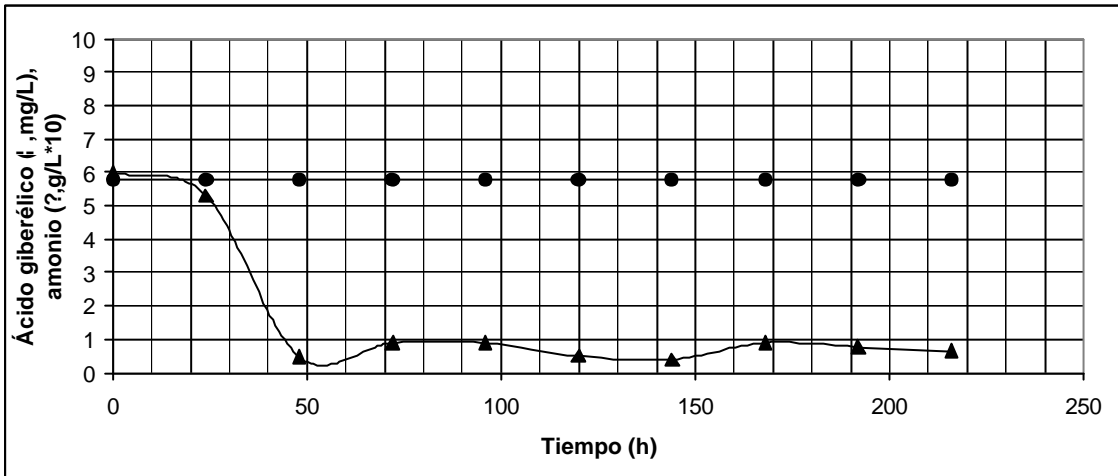


Figura No. 18.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 4, valores de Ácido giberélico y amonio.

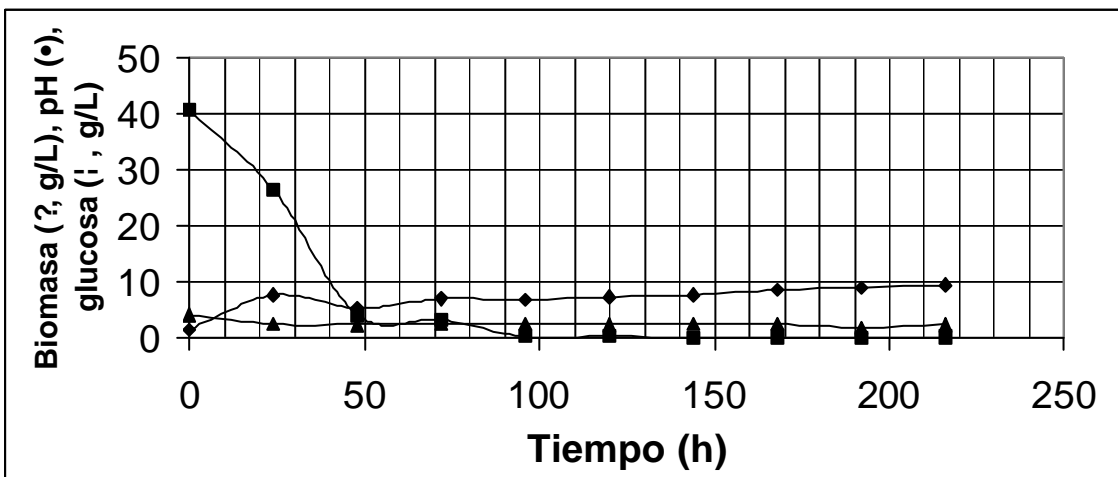


Figura No. 19.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 6, valores de biomasa, pH y glucosa.

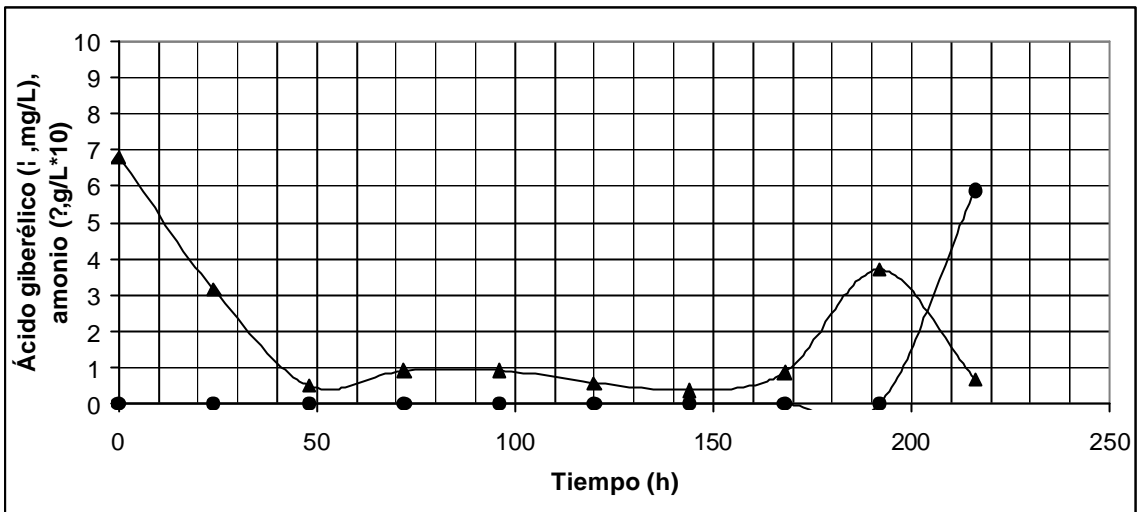


Figura No. 19.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 6, valores de ácido giberélico y amonio.

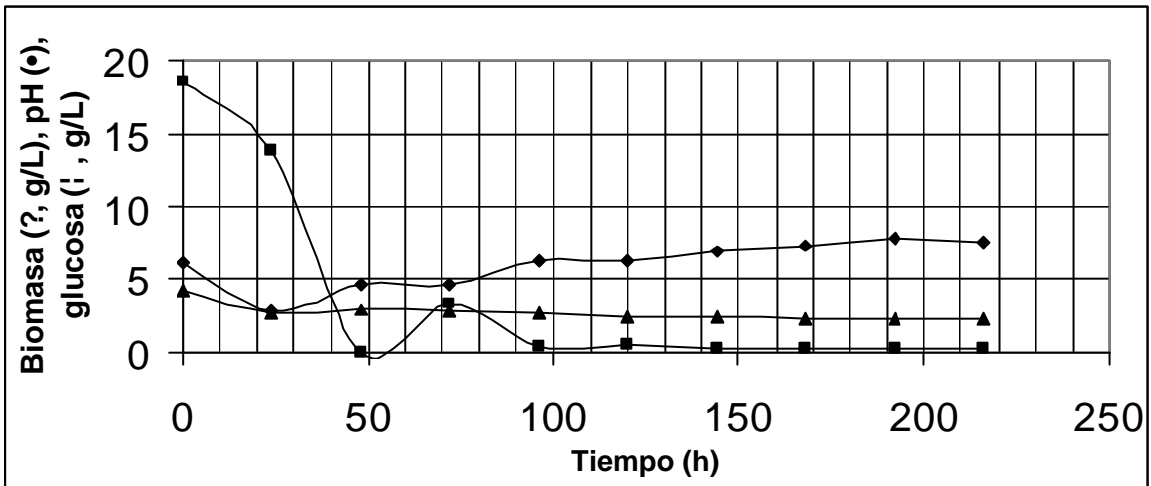


Figura No. 20.A: Cinética de producción de  cido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 7, valores de biomasa, pH y glucosa.

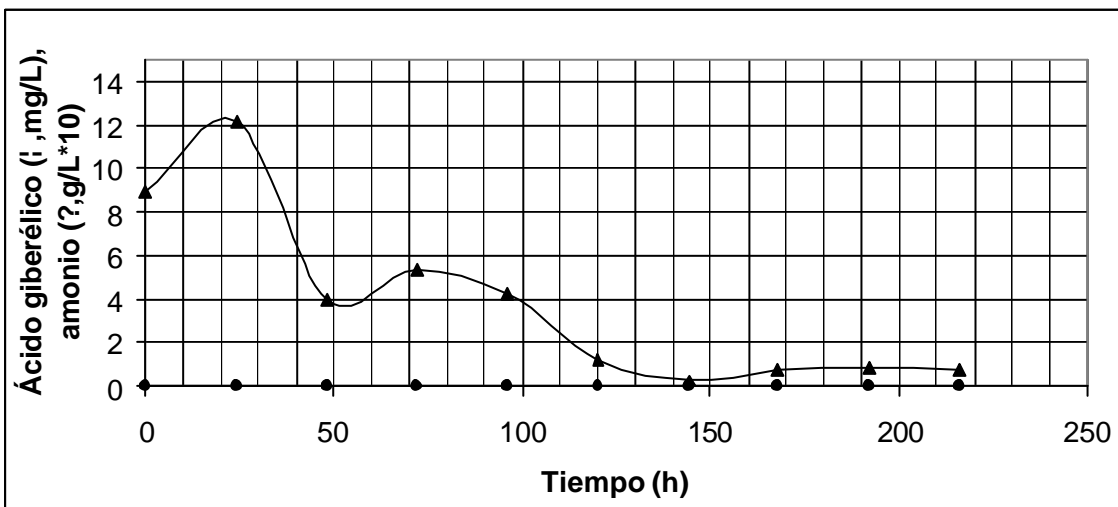


Figura No. 20.B: Cinética de producción de  cido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 7, valores de ácido giberélico y amonio.

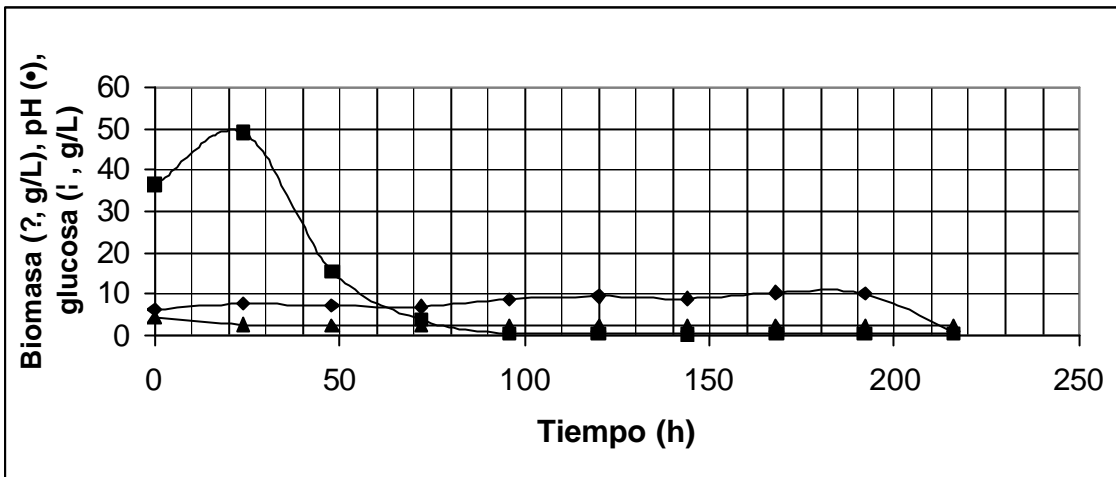


Figura No. 21.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 8, valores de biomasa, pH y glucosa.

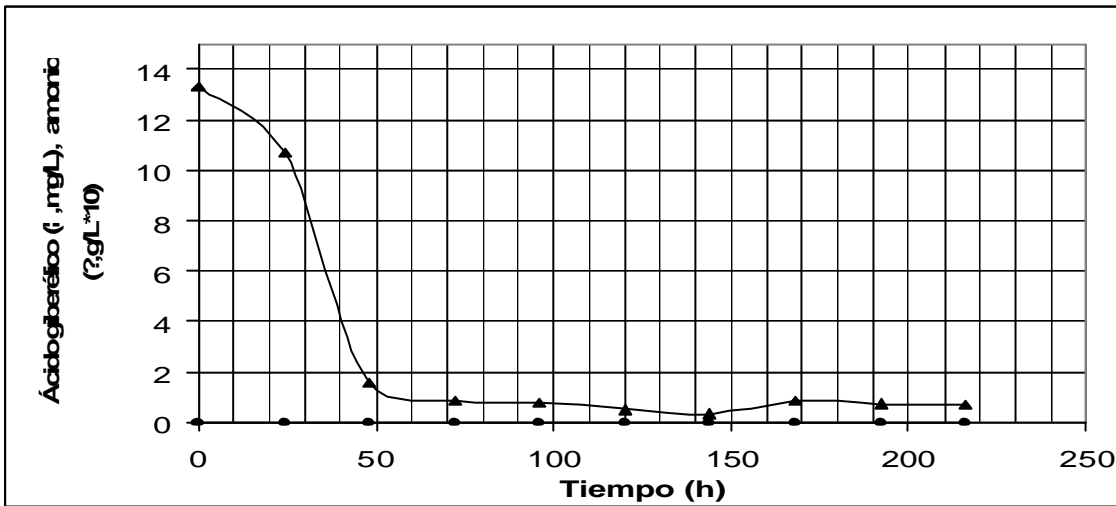


Figura No. 21.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 8, valores de Ácido giberélico y amonio.

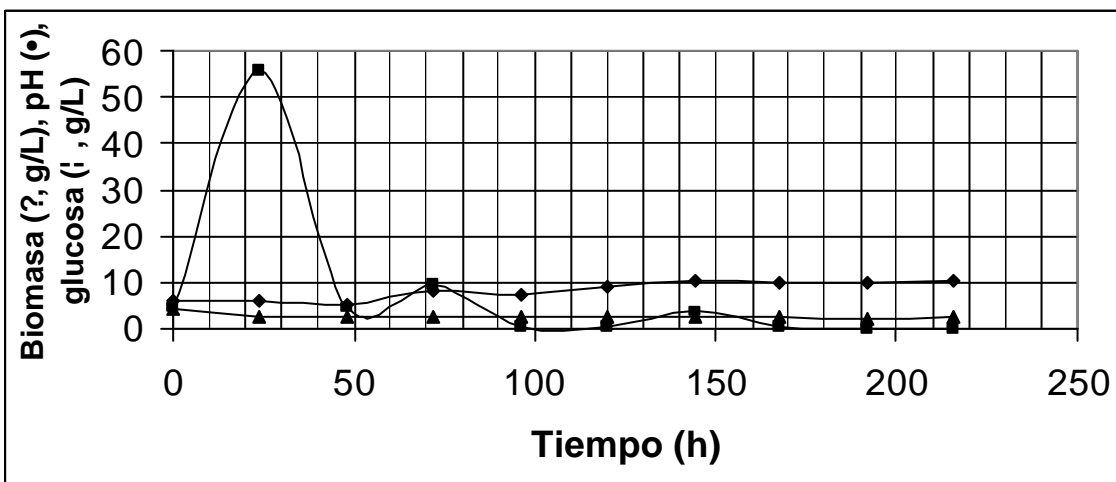


Figura No. 22.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL2278, experimento9, valores de biomasa, pH y glucosa.

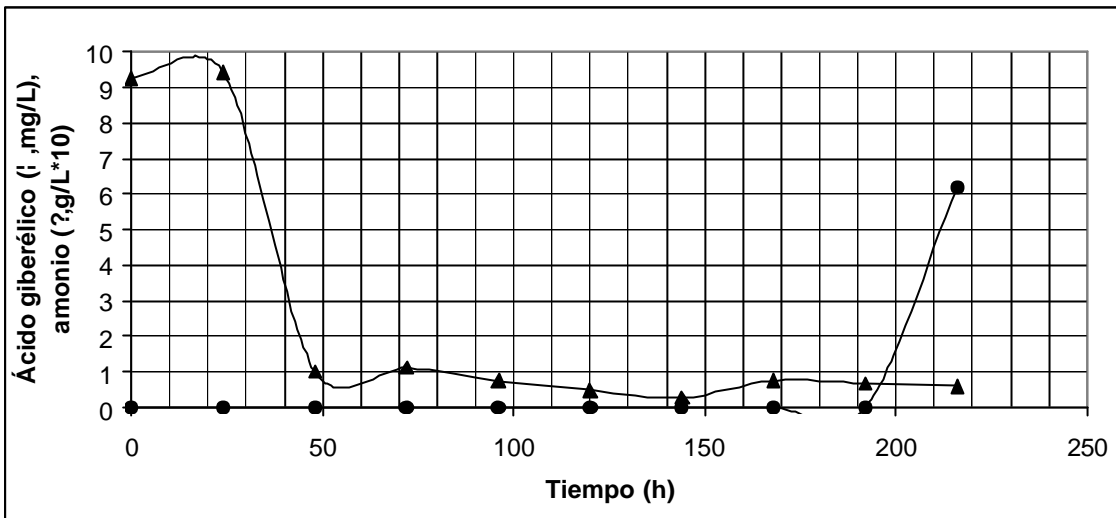


Figura No. 22.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 9, valores de Ácido giberélico y amonio.

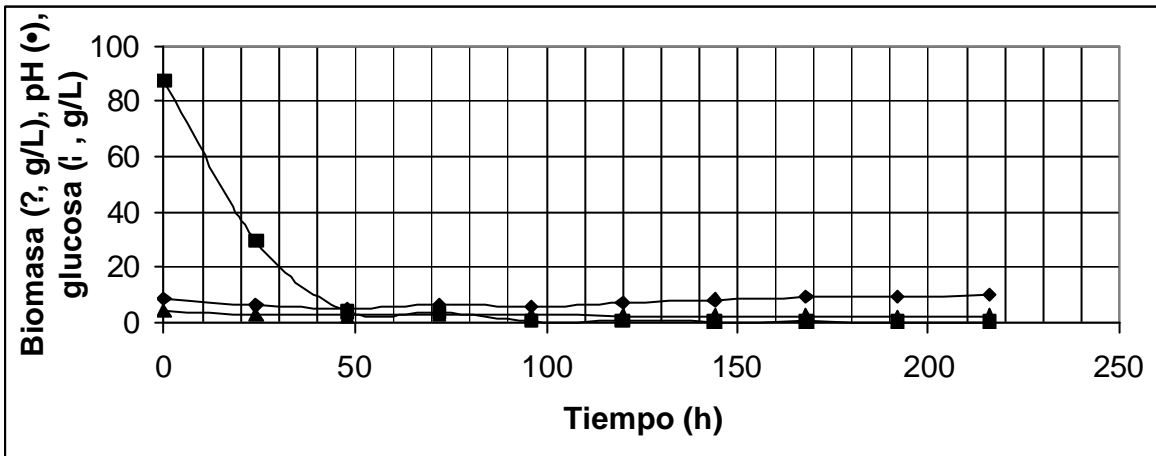


Figura No. 23.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 10, valores de biomasa, pH y glucosa.

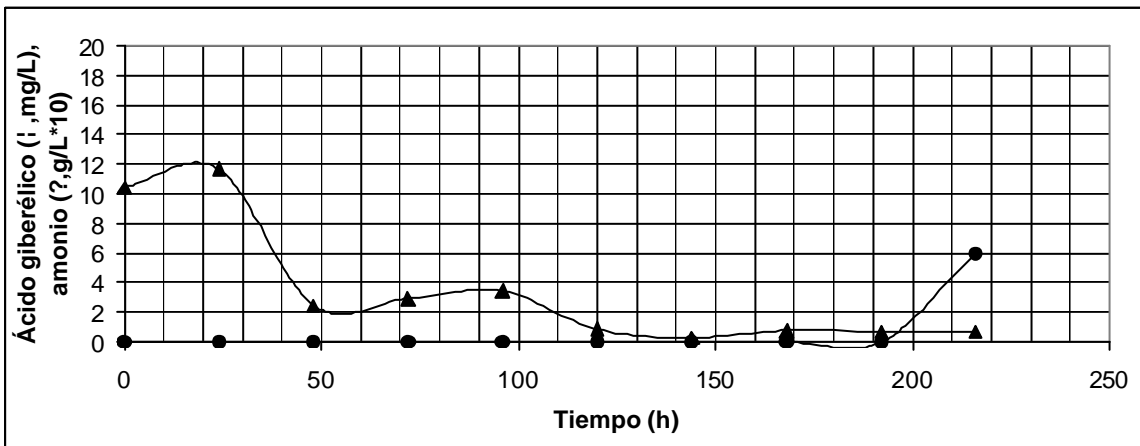


Figura No. 23.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 10, valores de Ácido giberélico y amonio.

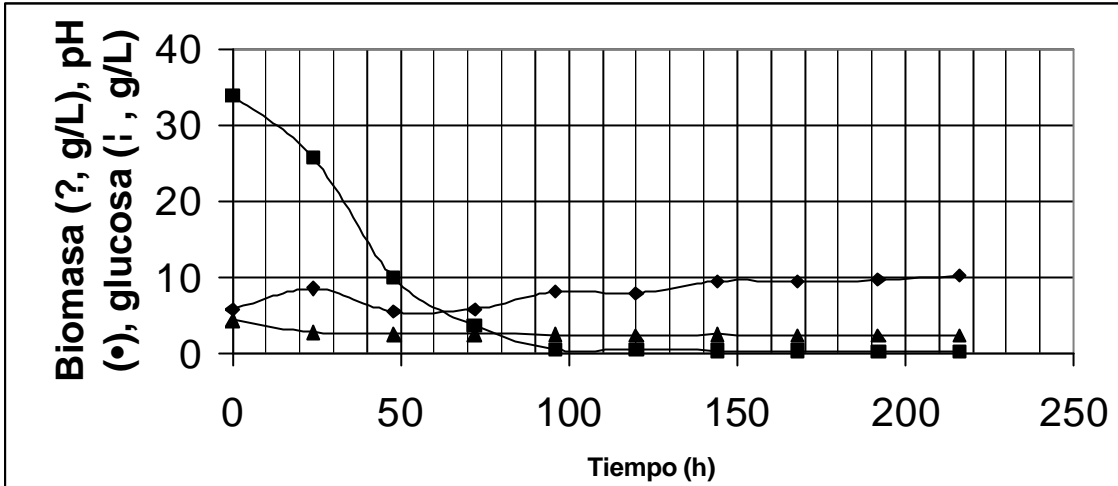


Figura No. 24.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 11 valores de biomasa, pH y glucosa.

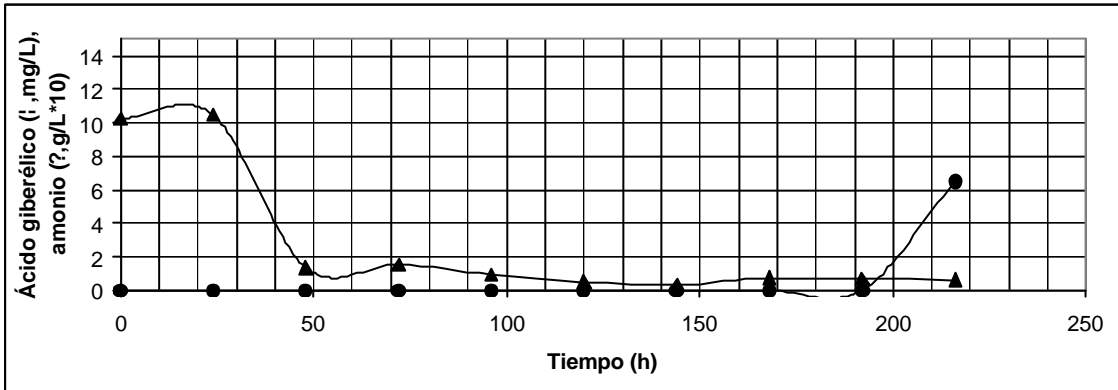


Figura No. 24.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 11, valores de Ácido giberélico y amonio.

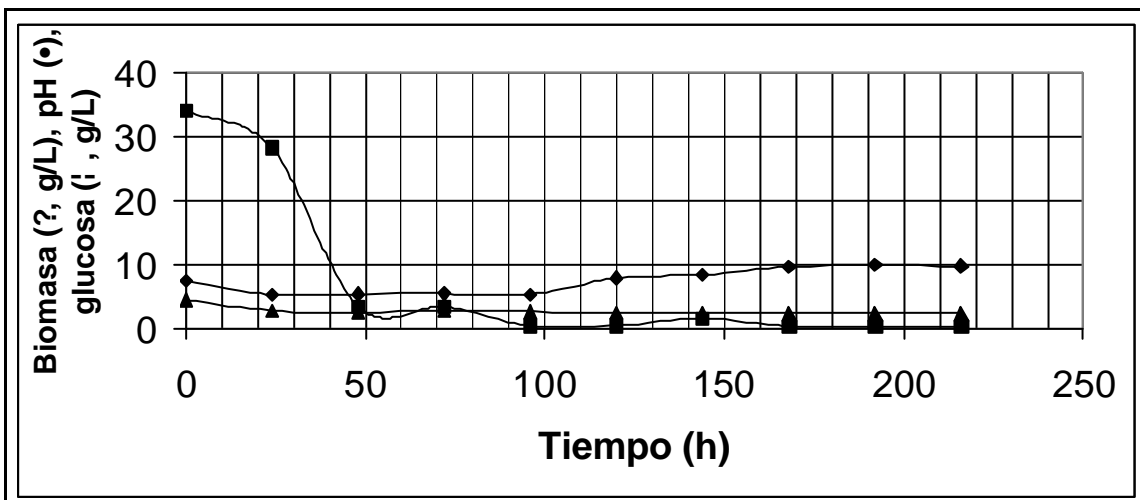


Figura No. 25.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 12, valores de biomasa, pH y glucosa.

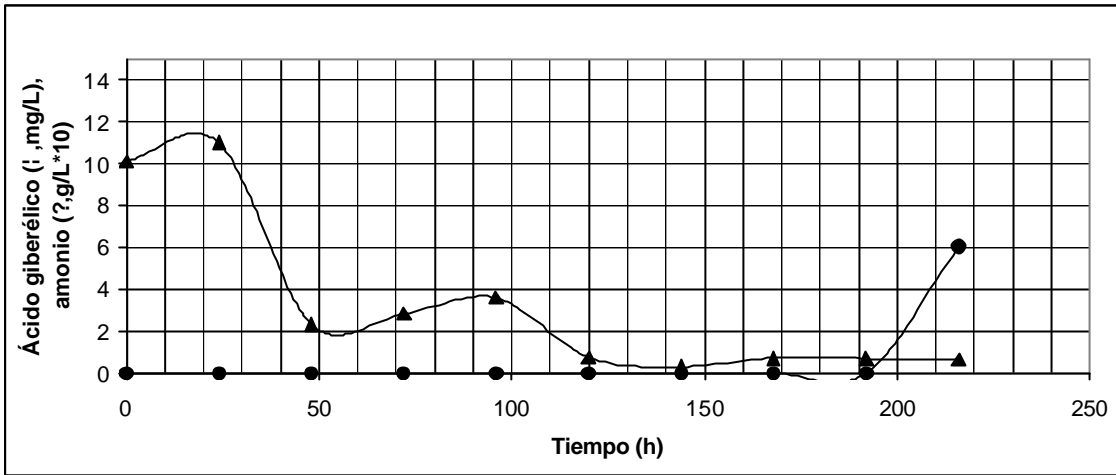


Figura No. 25.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matráz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2278, experimento 12, valores de Ácido giberélico y amonio.

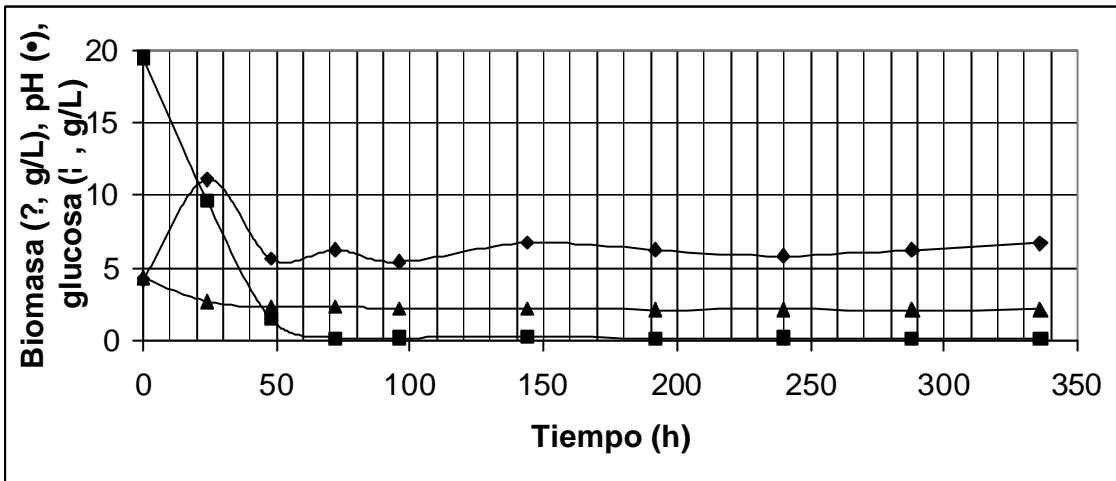


Figura No. 26.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matráz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 1, valores de biomasa, pH y glucosa.

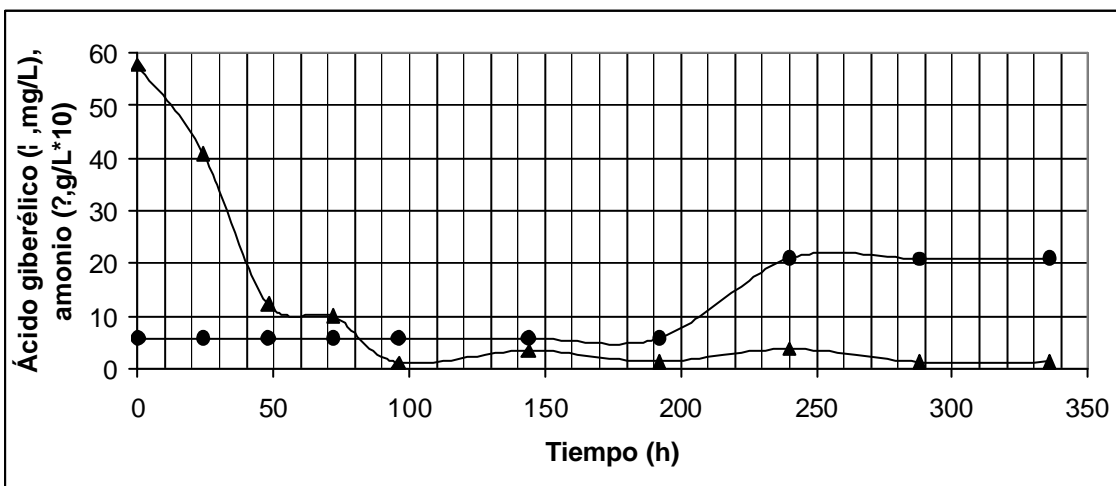


Figura No. 26.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matráz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 1, valores de Ácido giberélico y amonio.

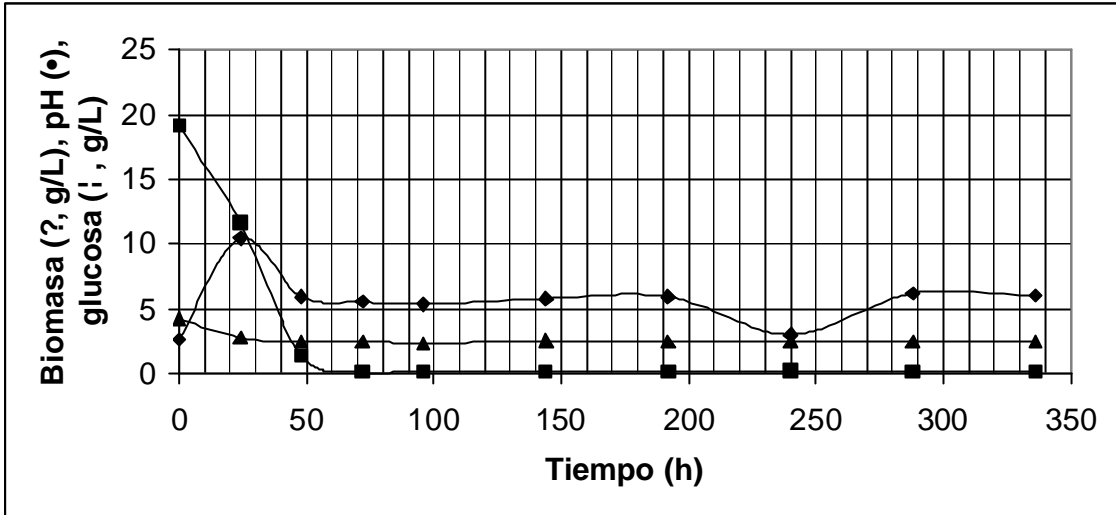


Figura No. 27.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 2, valores de biomasa, pH y glucosa.

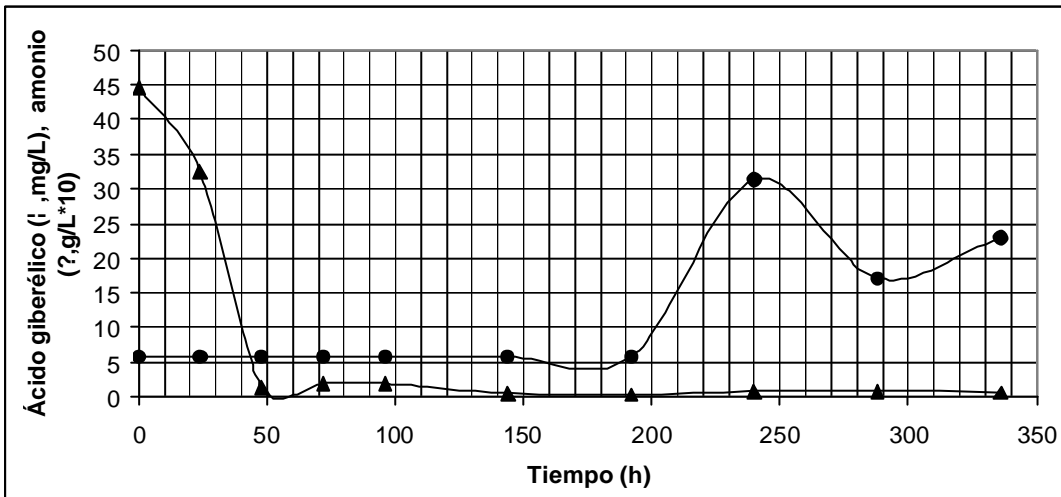


Figura No. 27.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 2, valores de Ácido giberélico y amonio.

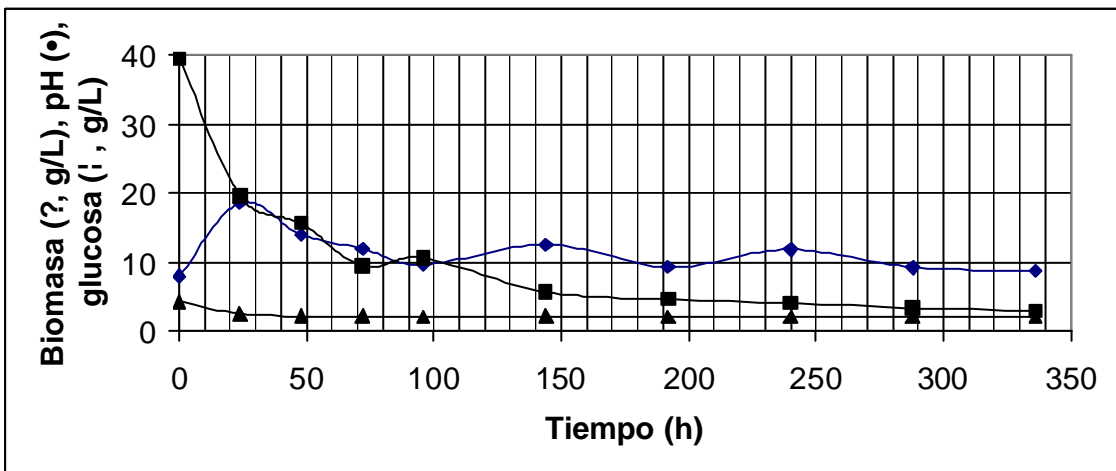


Figura No. 28.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 3, valores de biomasa, pH y glucosa.

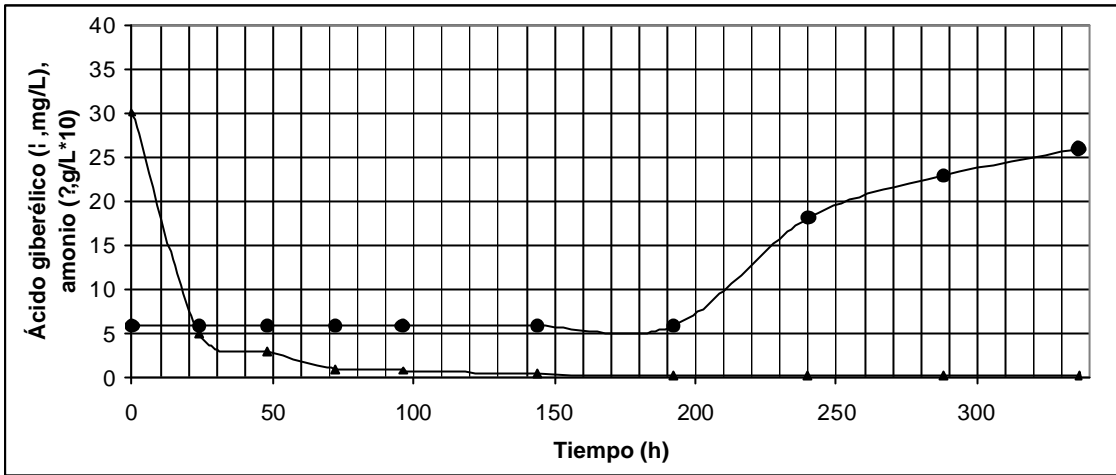


Figura No. 28.B: Cinética de producción de Ácido Giberérico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 3, valores de Ácido giberérico y amonio.

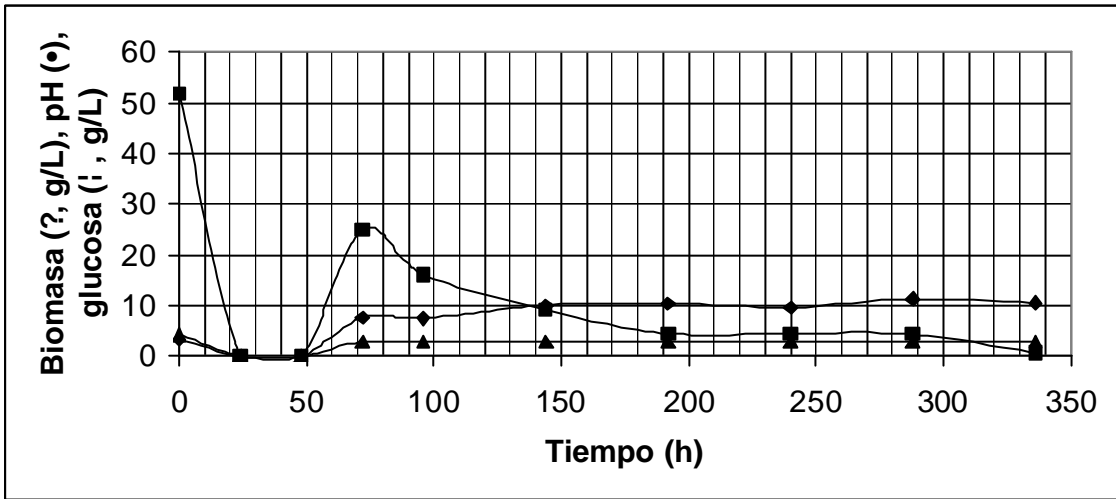


Figura No. 29.A: Cinética de producción de Ácido Giberérico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 4, valores de biomasa, pH y glucosa.

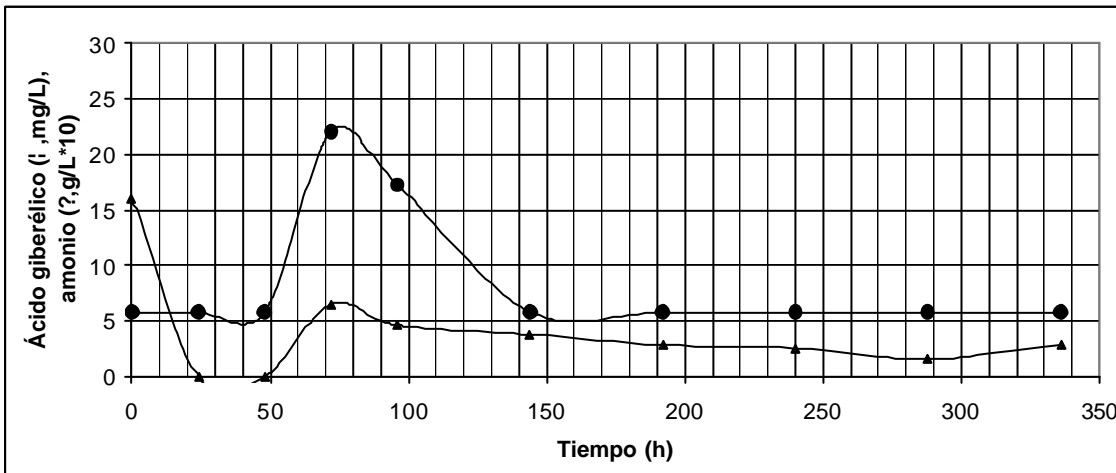


Figura No. 29.B: Cinética de producción de Ácido Giberérico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 4, valores de Ácido giberérico y amonio.

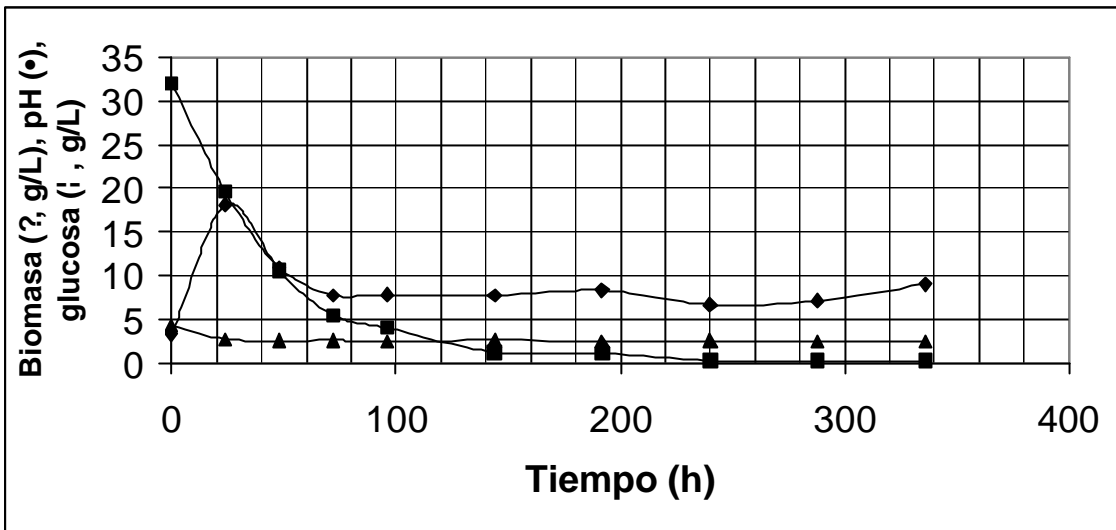


Figura No. 30.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 6, valores de biomasa, pH y glucosa.

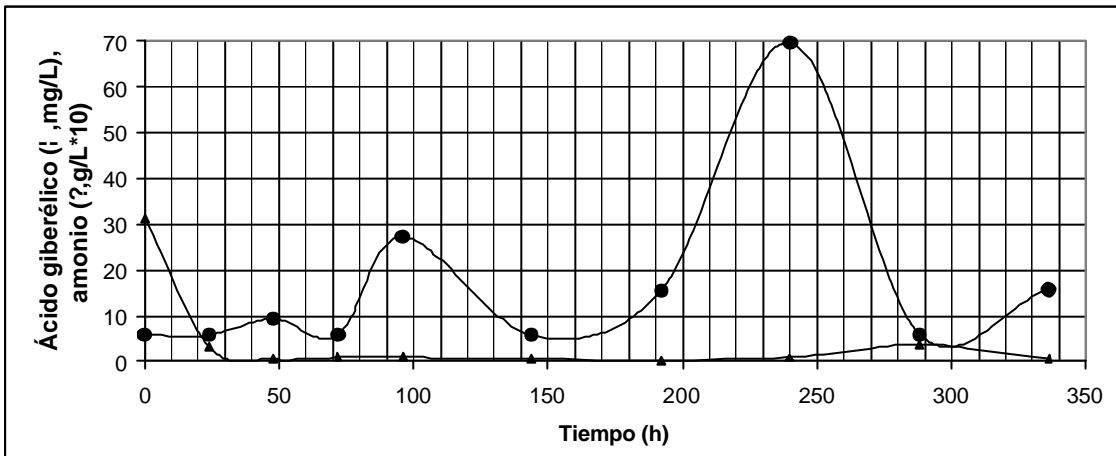


Figura No. 30.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 6, valores de Ácido giberélico y amonio.

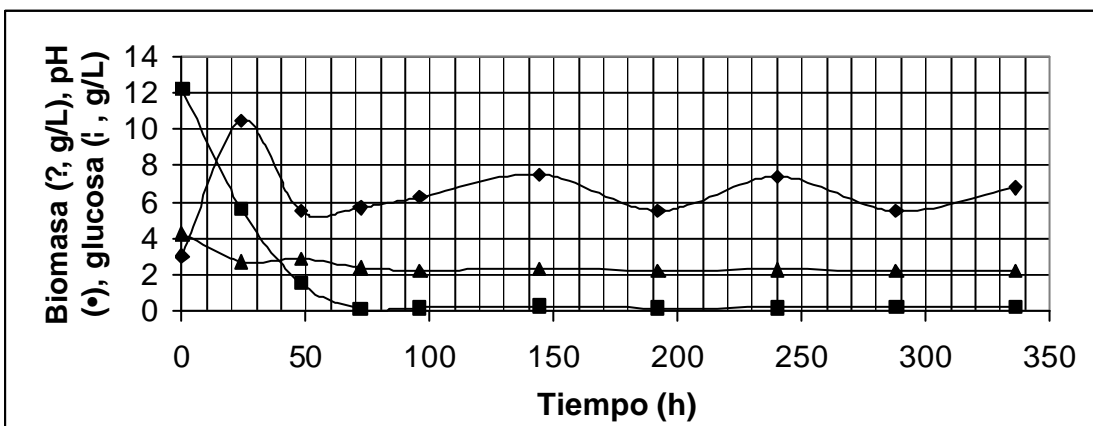


Figura No. 31.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 7, valores de biomasa, pH y glucosa.

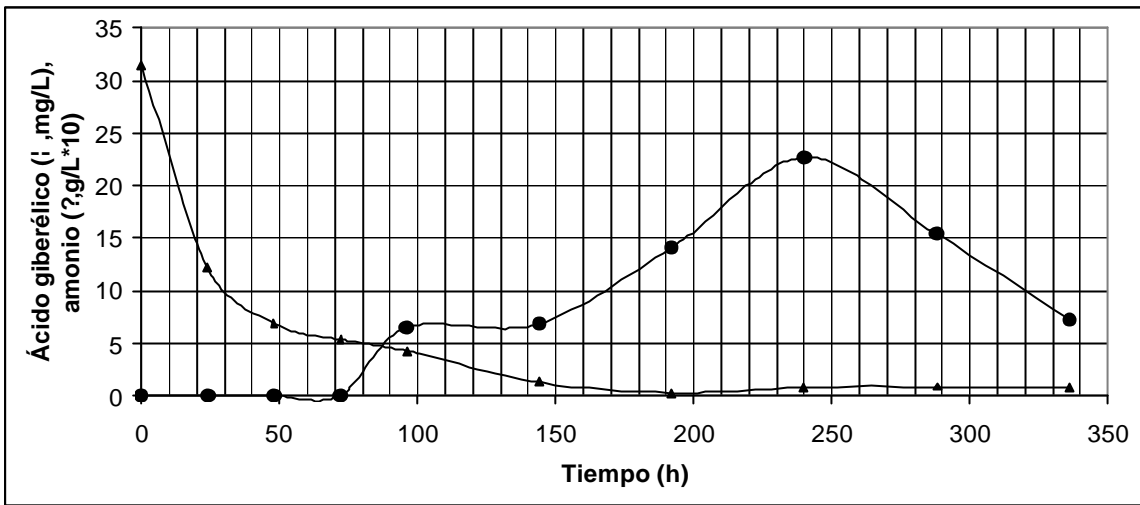


Figura No. 31.B: Cinética de producción de Ácido Giberérico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 7, valores de Ácido giberérico y amonio.

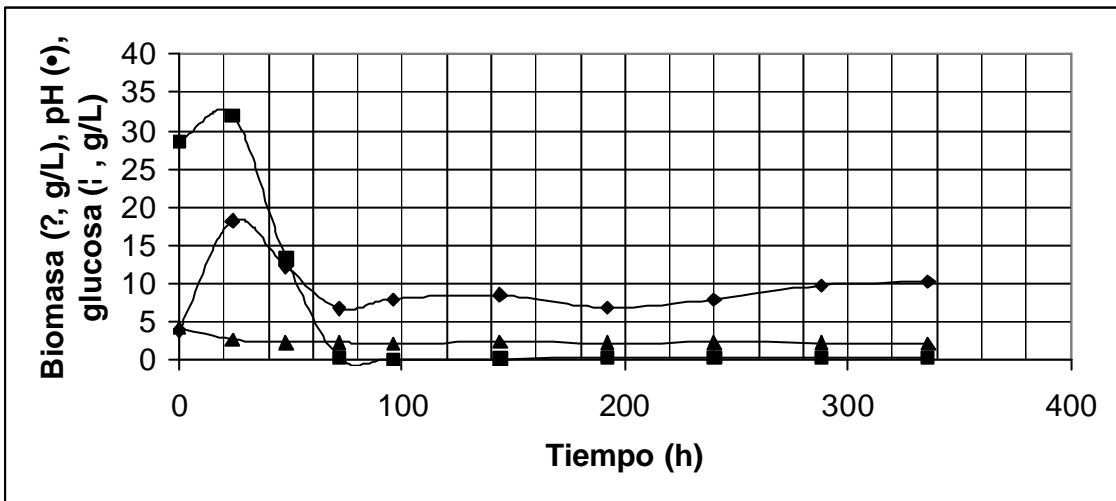


Figura No. 32.A: Cinética de producción de Ácido Giberérico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 8, valores de biomasa, pH y glucosa.

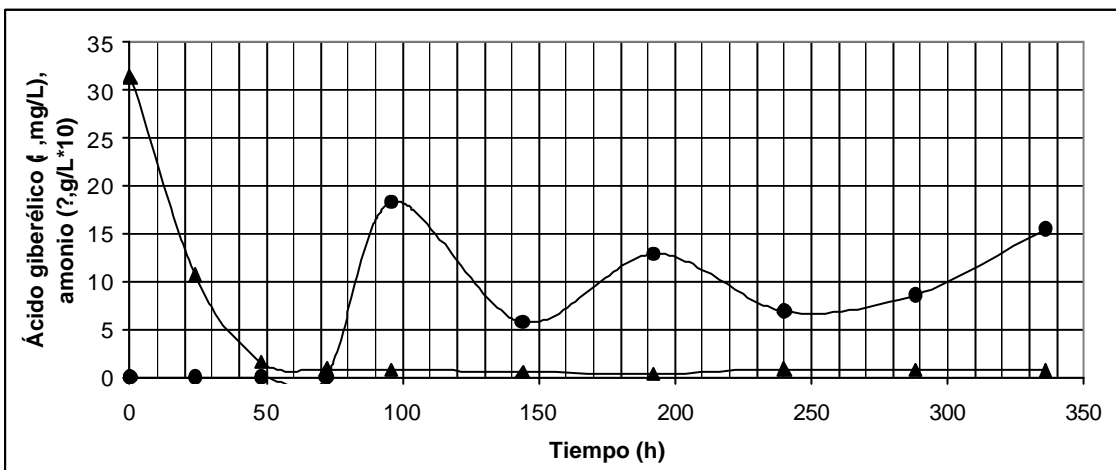


Figura No. 32.B: Cinética de producción de Ácido Giberérico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 8, valores de Ácido giberérico y amonio.

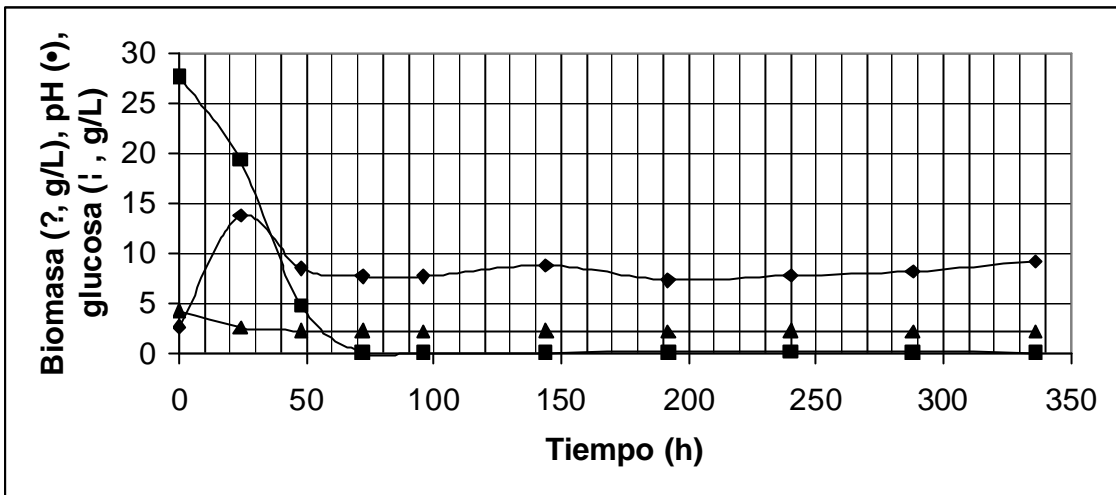


Figura No. 33.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 9, valores de biomasa, pH y glucosa.

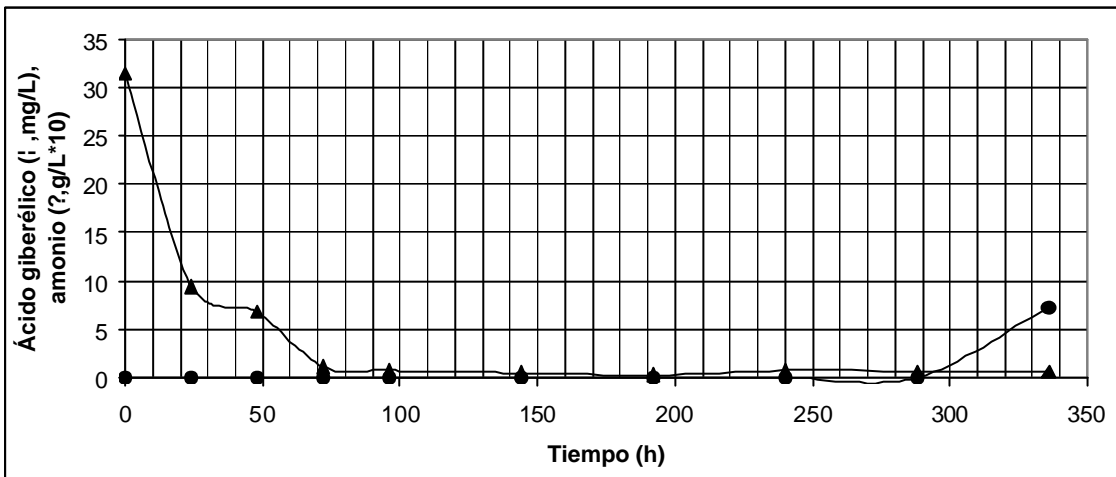


Figura No. 33.B: Cinética de producción de  cido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 9, valores de ácido giberélico y amonio.

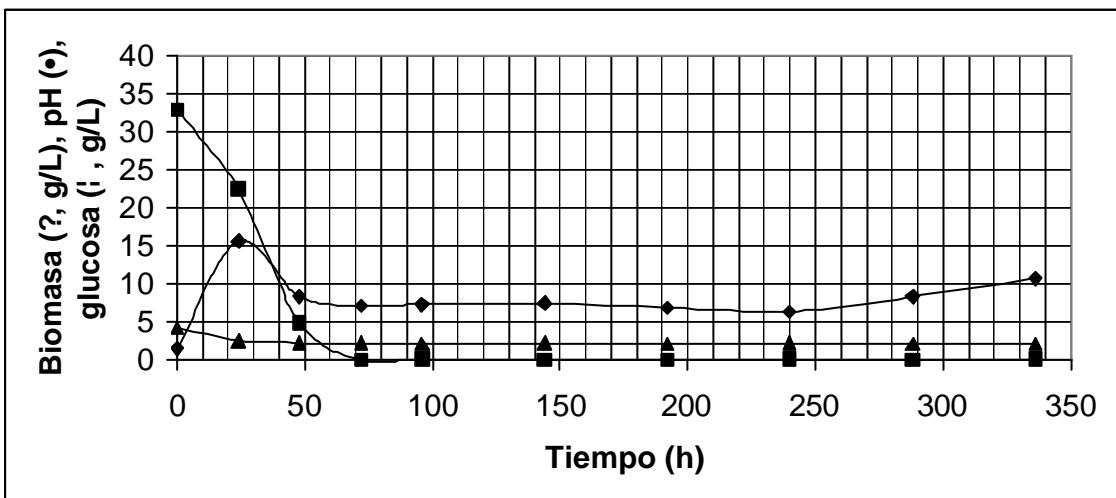


Figura No. 34.A: Cinética de producción de  cido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 10, valores de biomasa, pH y glucosa.

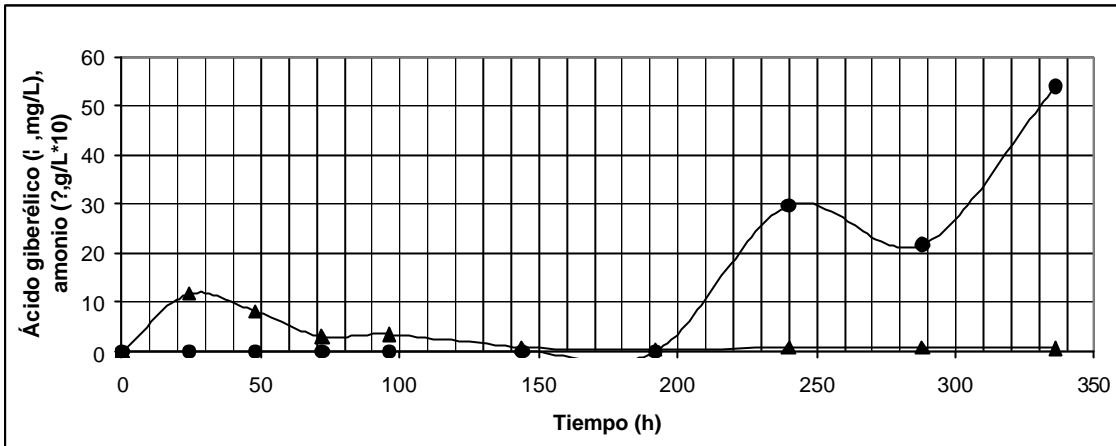


Figura No. 34.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matráz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 10, valores de Ácido giberélico y amonio.

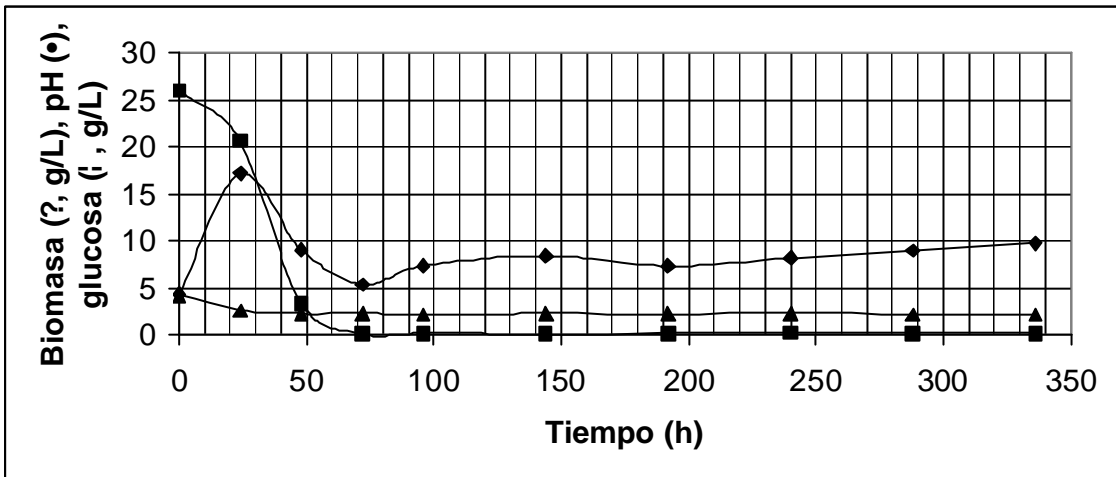


Figura No. 35.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matráz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 11, valores de biomasa, pH y glucosa.

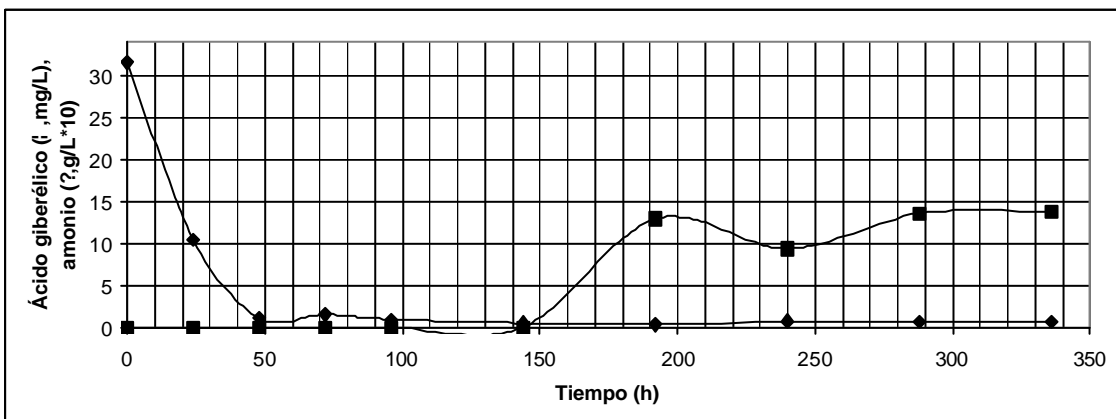


Figura No. 35.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matráz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 11, valores de Ácido giberélico y amonio.

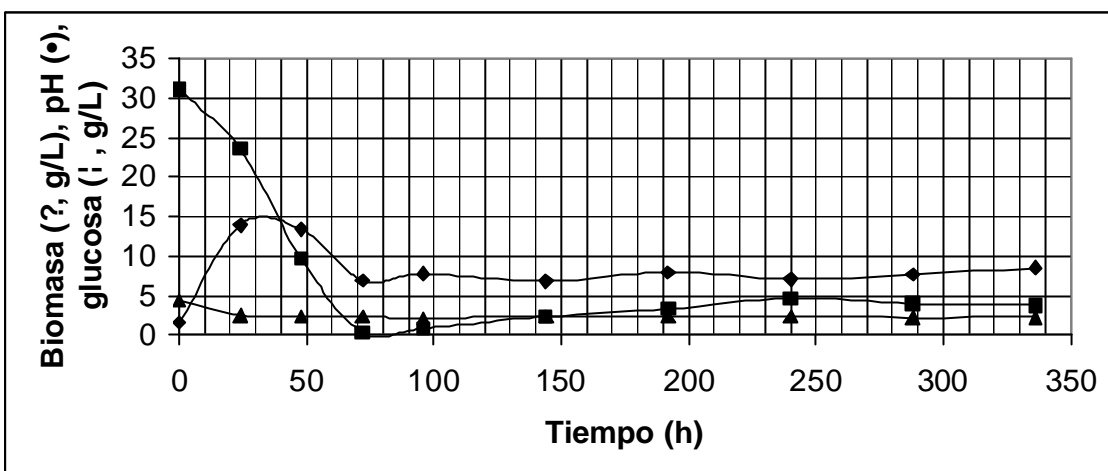


Figura No. 36.A: Cinética de producción de Ácido Giberérico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 12, valores de biomasa, pH y glucosa.

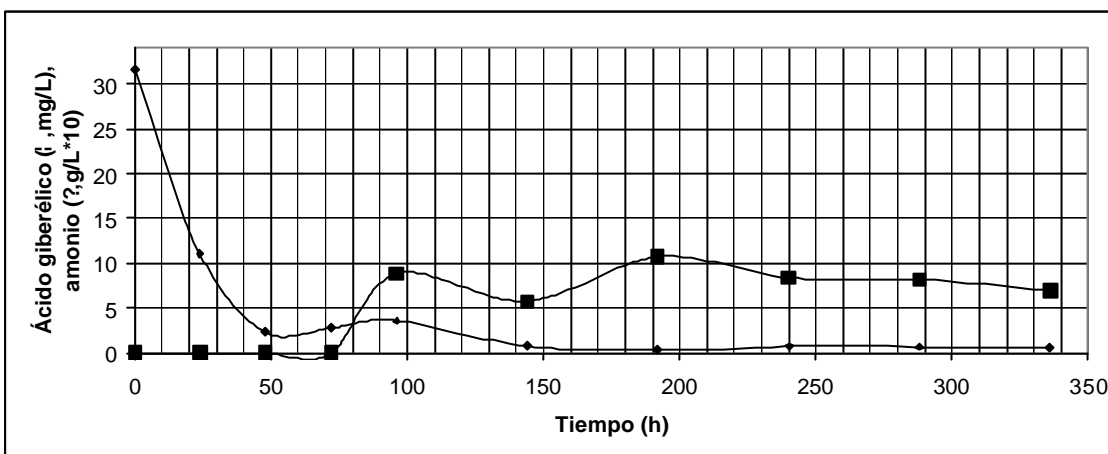


Figura No. 36.B: Cinética de producción de Ácido Giberérico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 12, valores de Ácido giberérico y amonio.

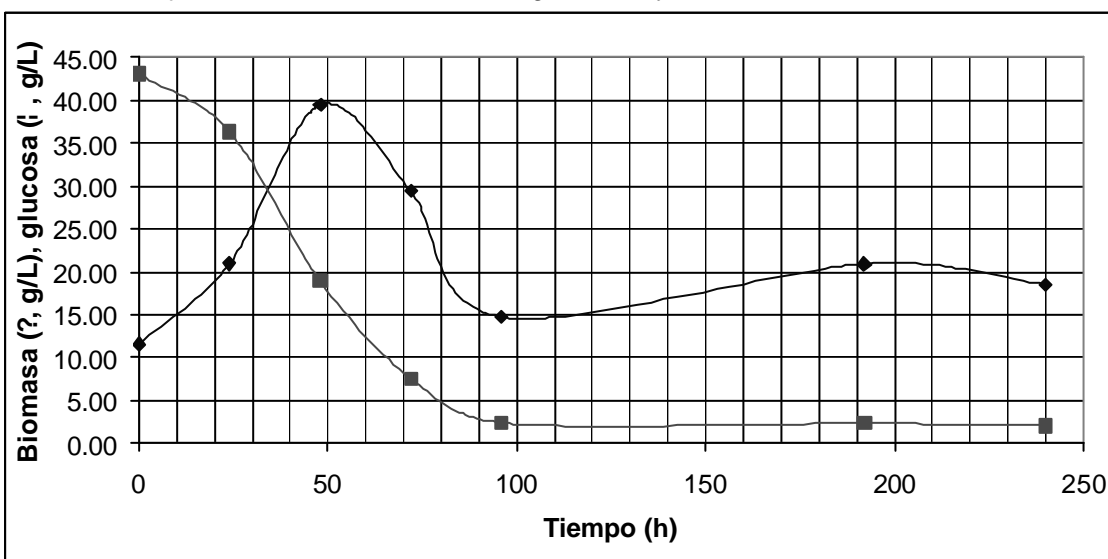


Figura No. 37.A: Cinética de producción de Ácido Giberérico en biorreactor con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 1, valores de biomasa y glucosa.

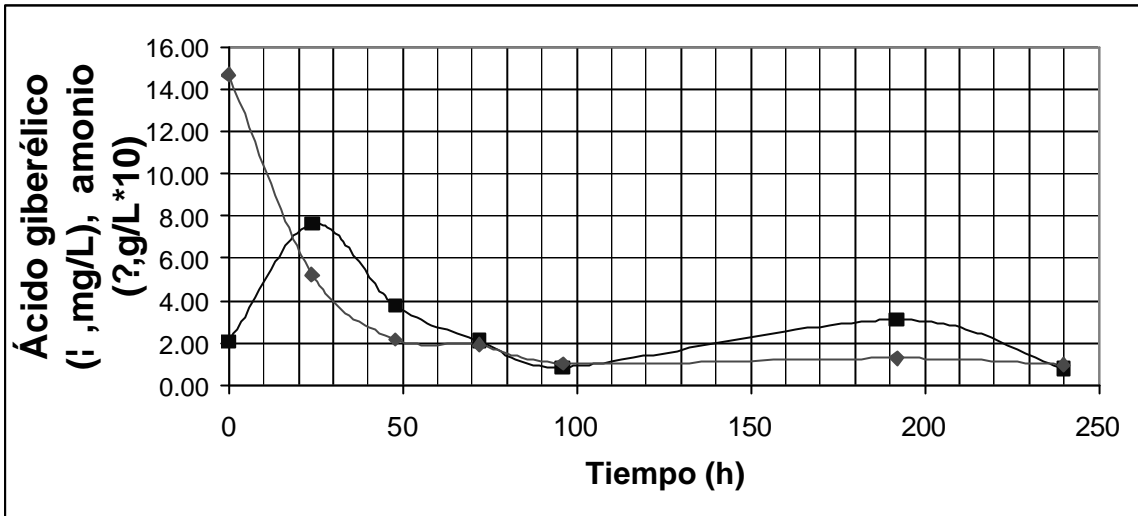


Figura No. 37.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matráz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 1, valores de Ácido giberélico y amonio.

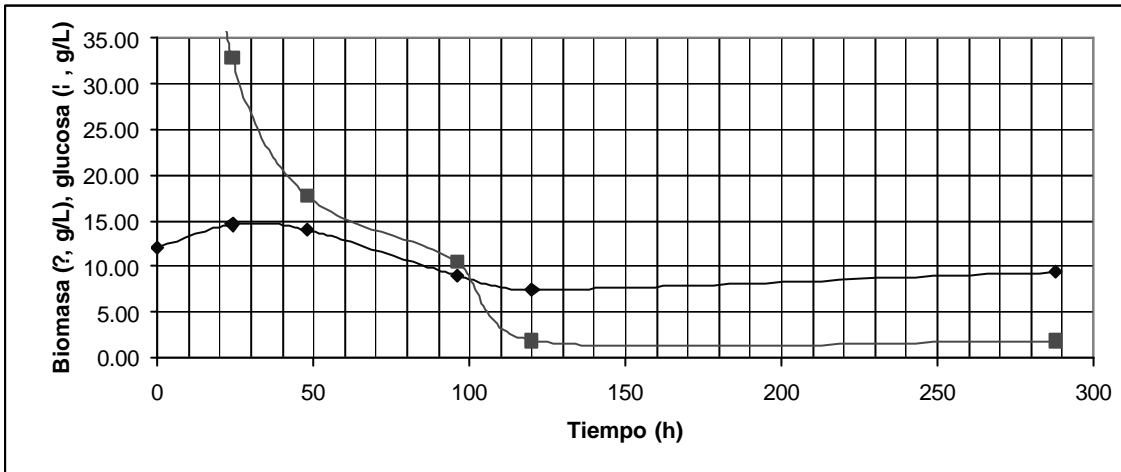


Figura No. 37.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en biorreactor con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 2, valores de biomasa y glucosa.

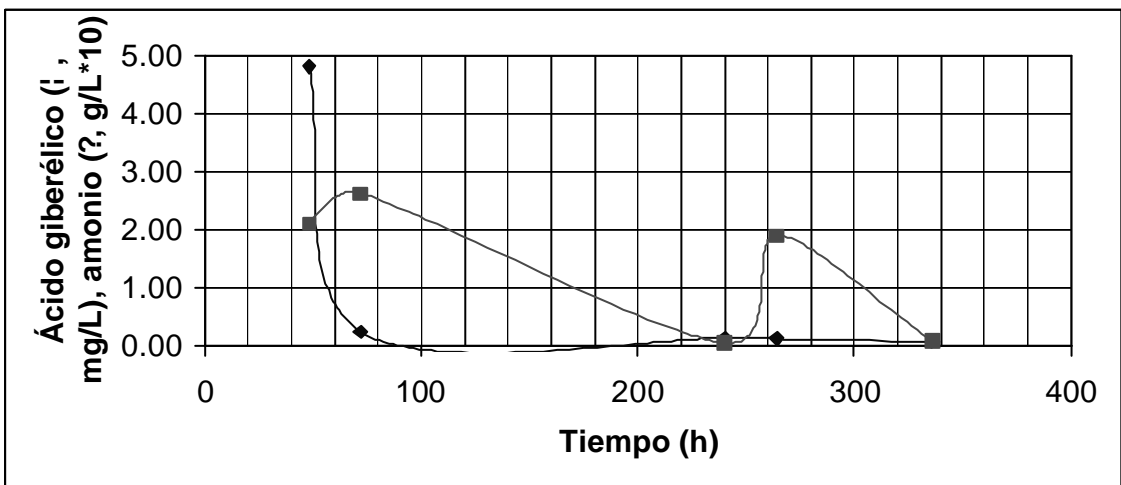


Figura No. 37.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en biorreactor con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 2, valores de Ácido giberélico y amonio.

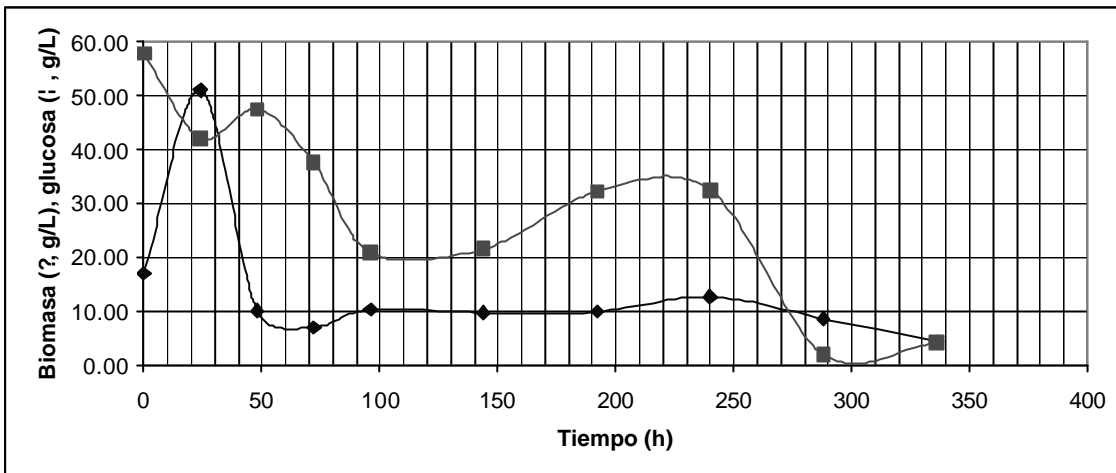


Figura No. 38.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en biorreactor con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 3, valores de biomasa y glucosa.

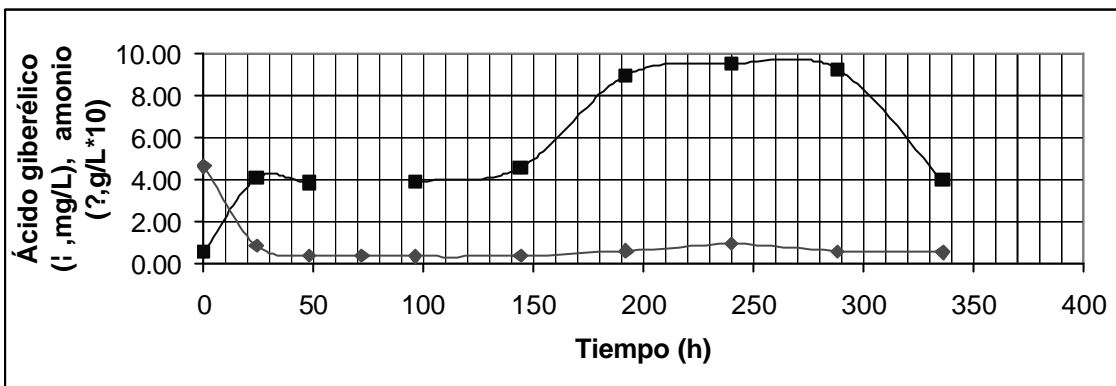


Figura No. 38.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 3, valores de ácido giberélico y amonio.

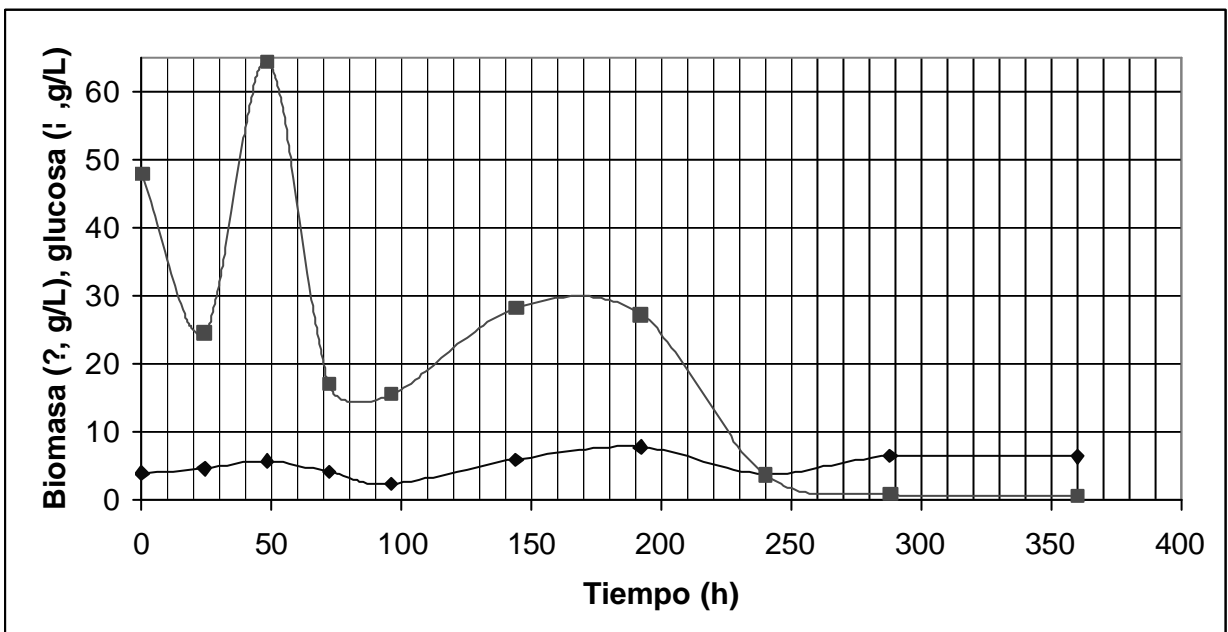


Figura No. 39.A: Cinética de producción de  cido Giberélico en biorreactor con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 4, valores de biomasa y glucosa.

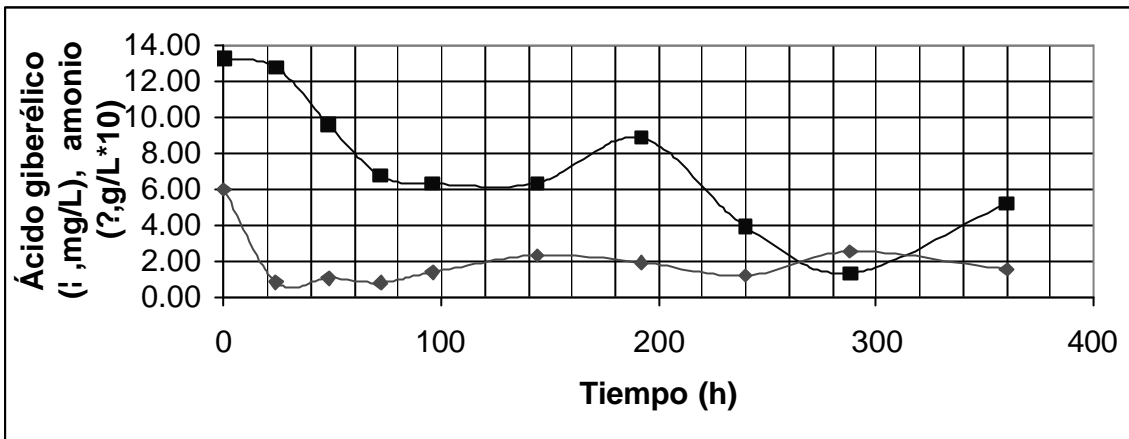


Figura No. 39.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 4, valores de Ácido giberélico y amonio.

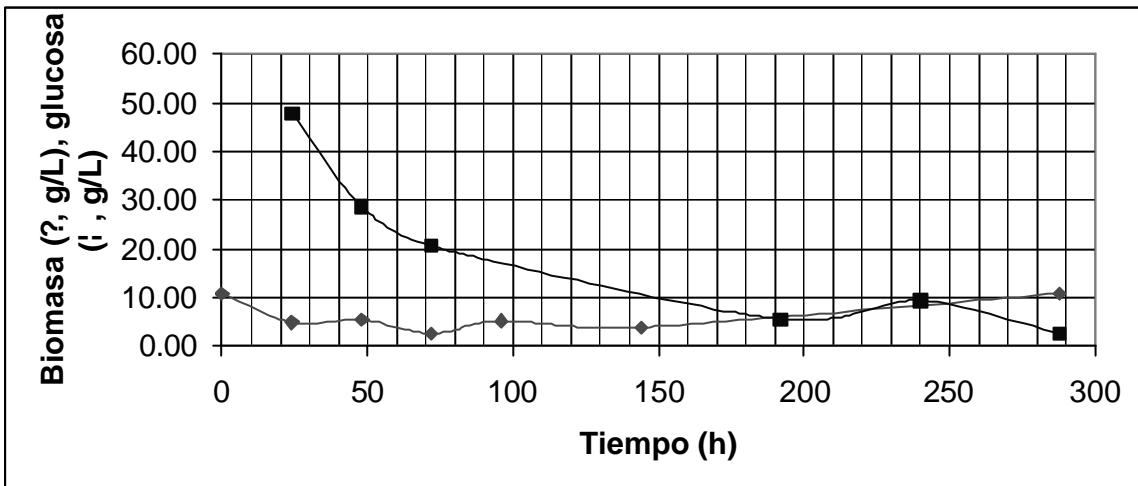


Figura No. 40.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en biorreactor con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 5, valores de biomasa y glucosa.

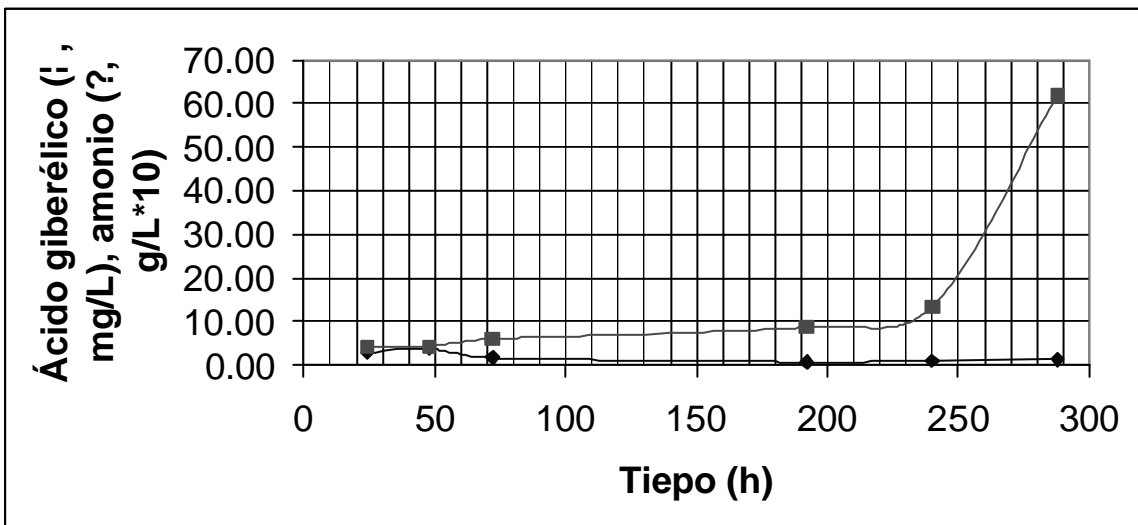


Figura No. 40.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 5, valores de Ácido giberélico y amonio.

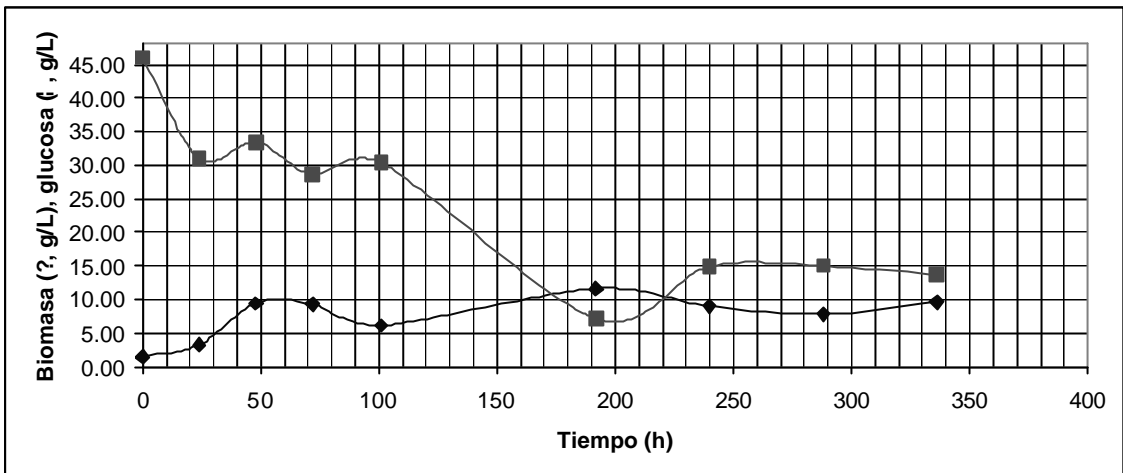


Figura No. 41.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en biorreactor con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 6, valores de biomasa y glucosa.

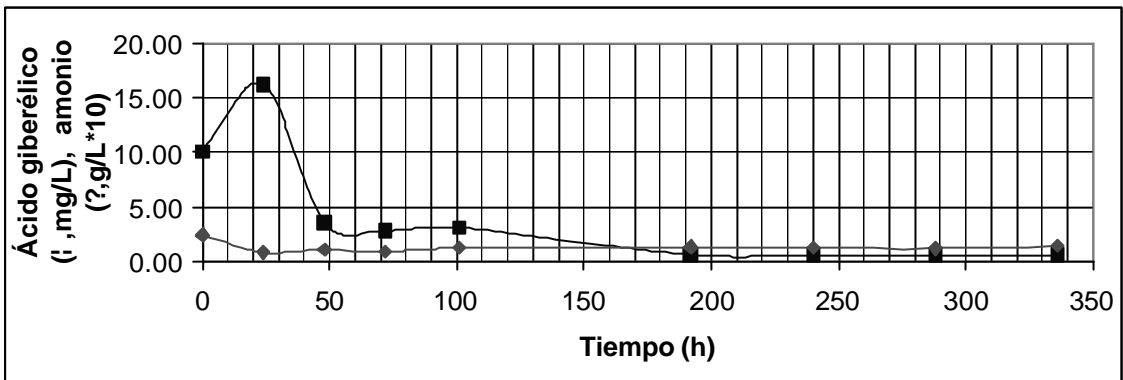


Figura No. 41.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 6, valores de ácido giberélico y amonio.

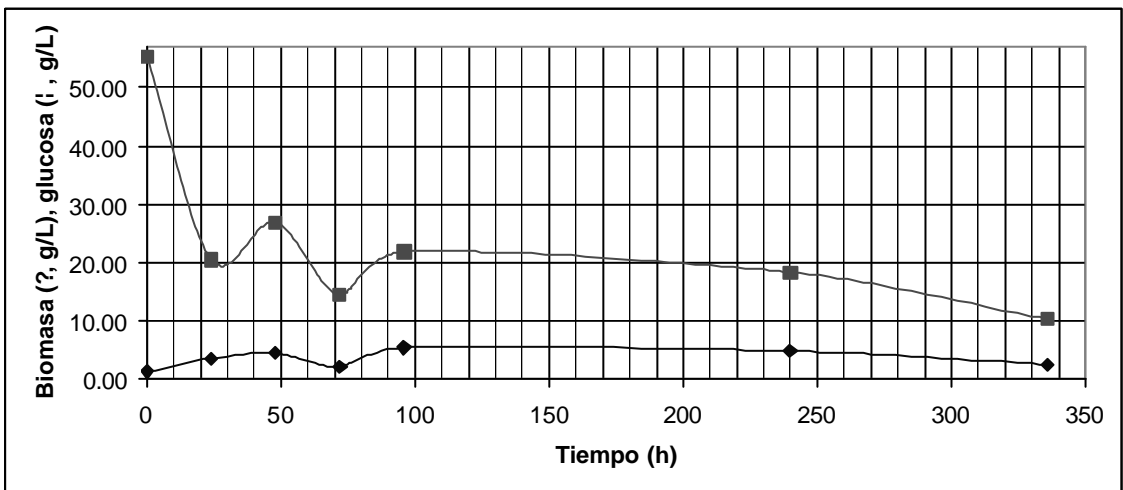


Figura No. 42.A: Cinética de producción de  cido Giberélico en biorreactor con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 7, valores de biomasa y glucosa.

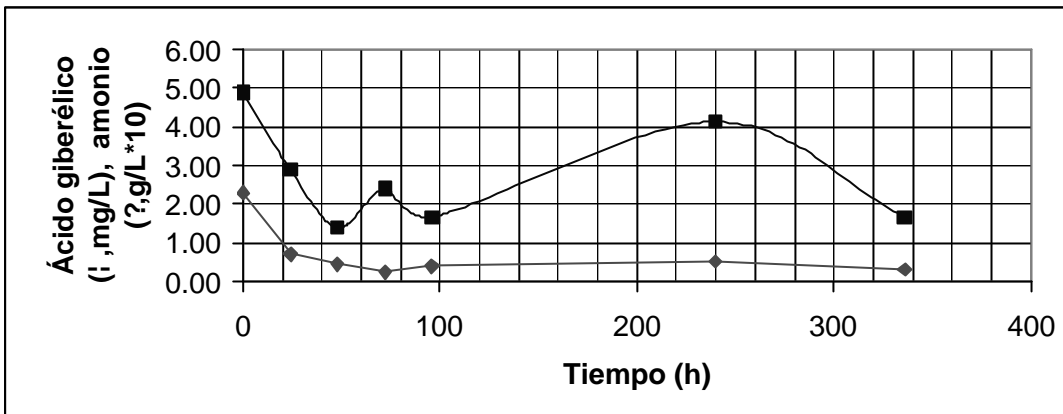


Figura No. 42.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 7, valores de ácido giberélico y amonio.

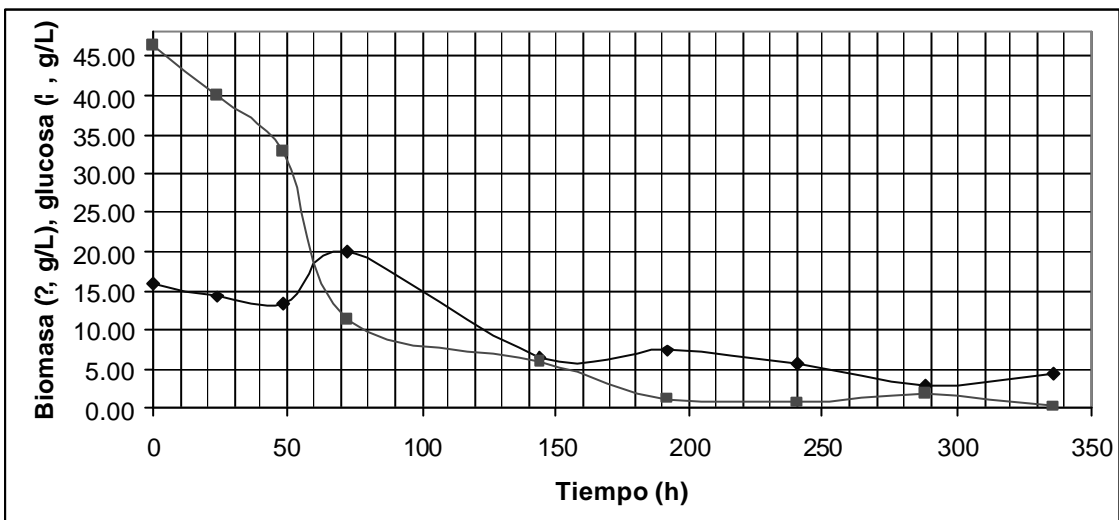


Figura No. 43.A: Cinética de producción de  cido Giberélico en biorreactor con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 8, valores de biomasa y glucosa.

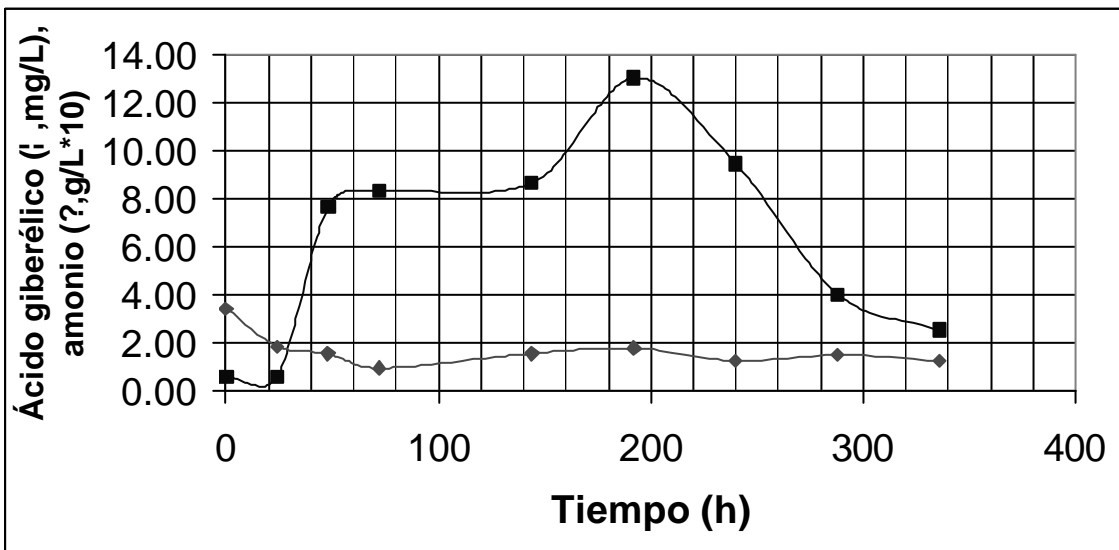


Figura No. 43.B: Cinética de producción de  cido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 8, valores de ácido giberélico y amonio.

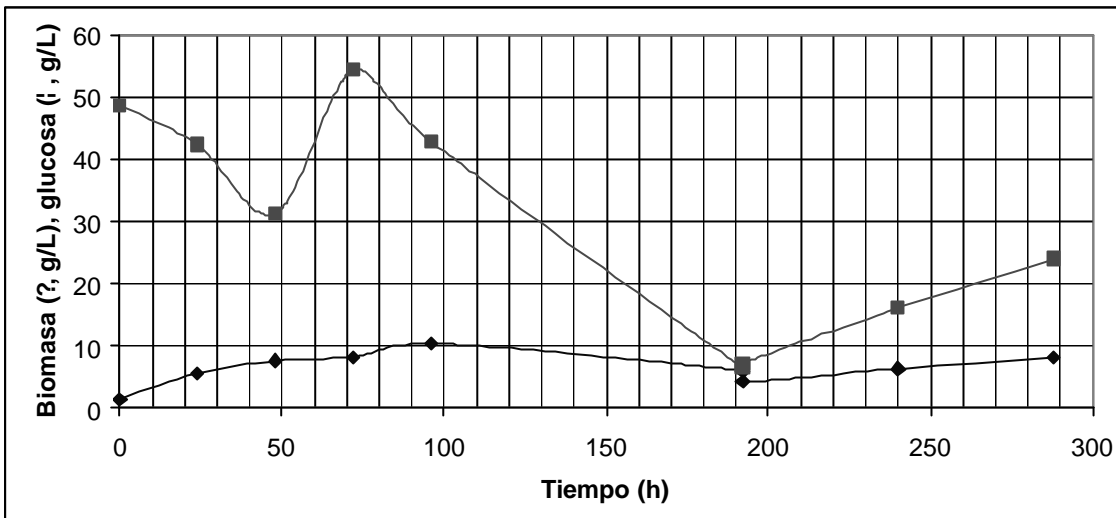


Figura No. 44.A: Cinética de producción de Ácido Giberélico en biorreactor con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 9, valores de biomasa y glucosa.

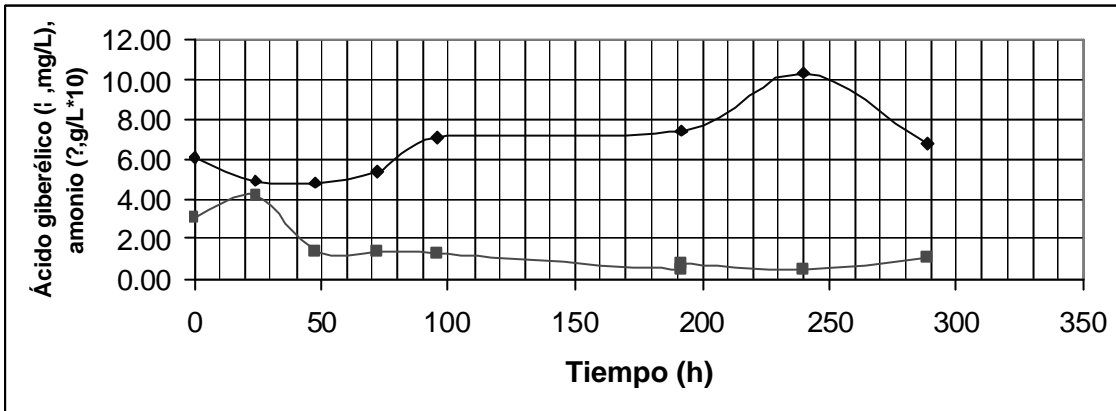


Figura No. 44.B: Cinética de producción de Ácido Giberélico en matr az con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 9, valores de ácido giberélico y amonio.

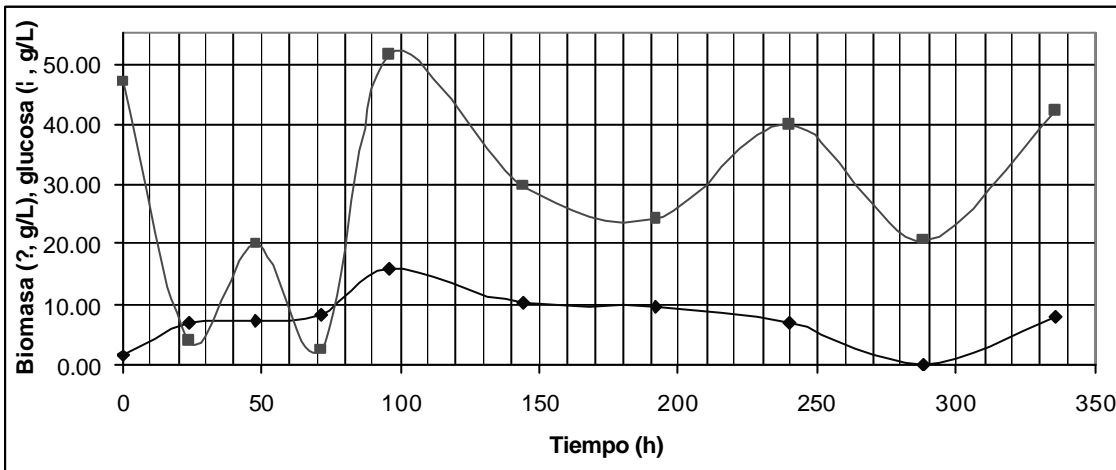


Figura No. 45.A: Cinética de producción de  cido Giberélico en biorreactor con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 10, valores de biomasa y glucosa.

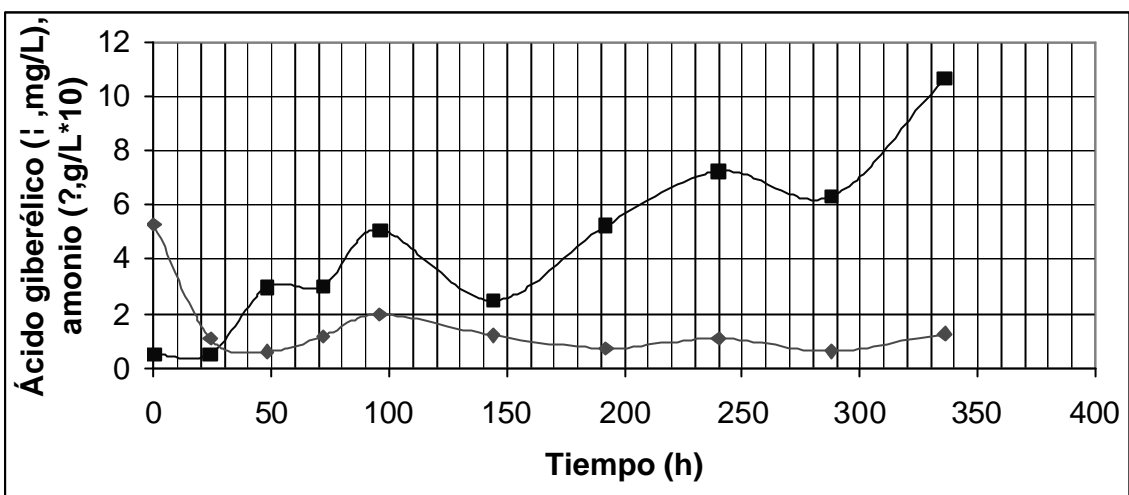


Figura No. 45.B: Cinética de producción de Ácido Giberérico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 10, valores de Ácido giberérico y amonio.

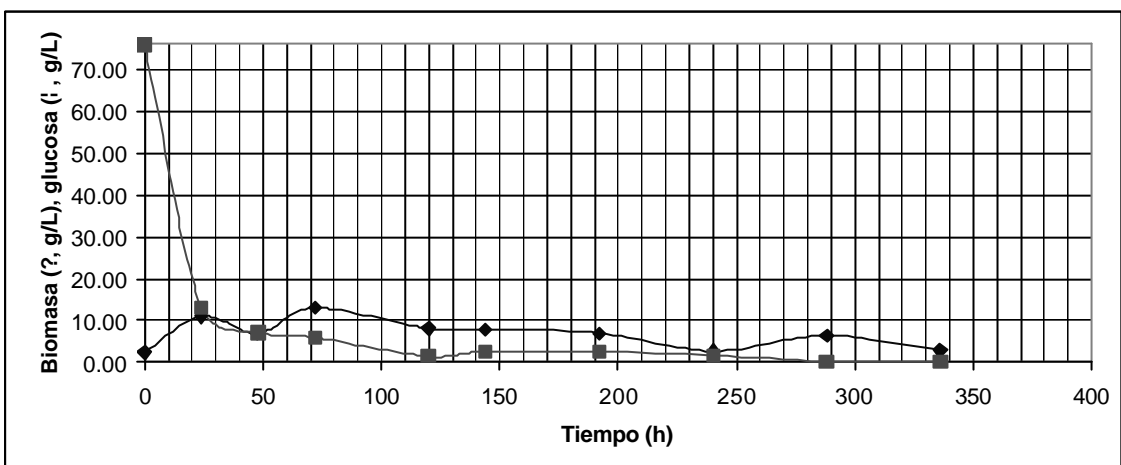


Figura No. 46.A: Cinética de producción de Ácido Giberérico en biorreactor con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 11, valores de biomasa y glucosa.

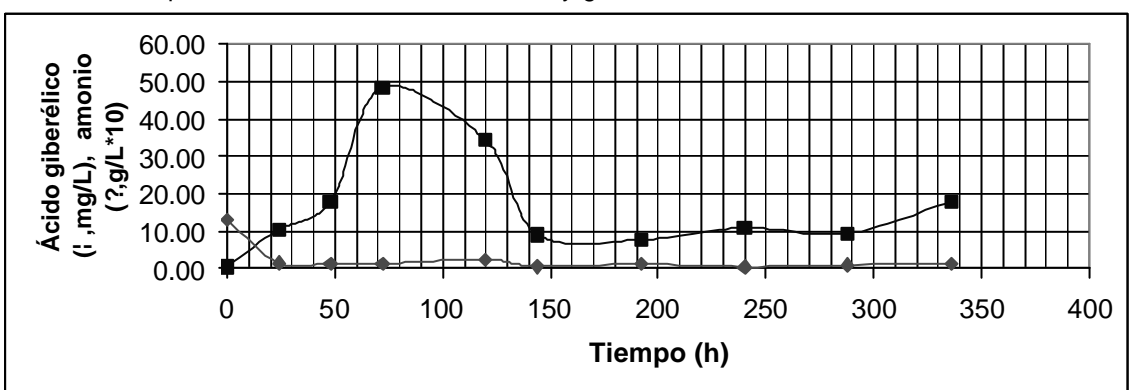


Figura No. 46.B: Cinética de producción de Ácido Giberérico en matríz con la cepa *G. fujikuroi* NRRL 2284, experimento 11, valores de Ácido giberérico y amonio.

ANEXO II (RUTA METABÓLICA DE SÍNTESIS DEL AG3)

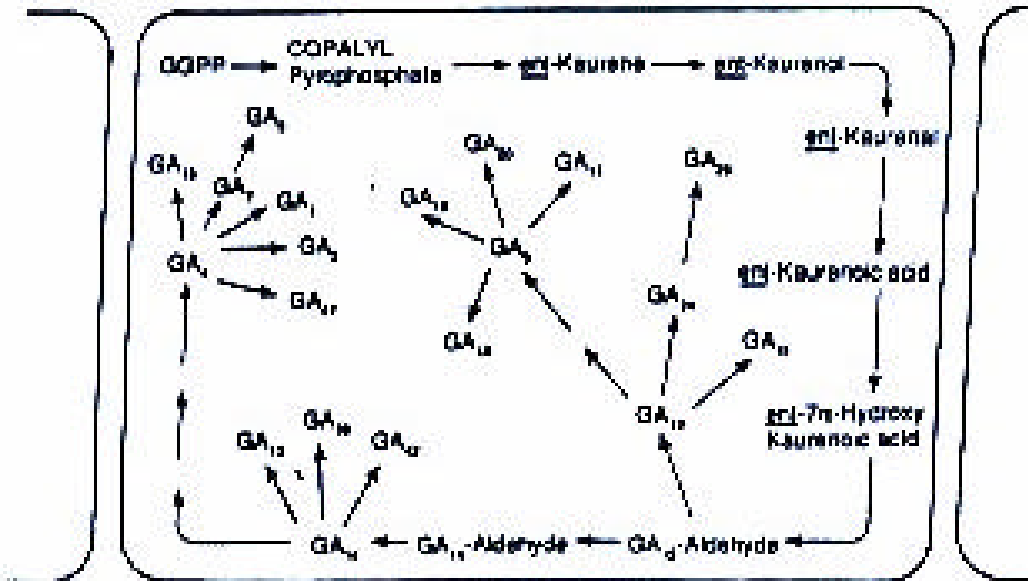


Fig. No. 47. Diagrama básico de la ruta metabólica de giberelinas.

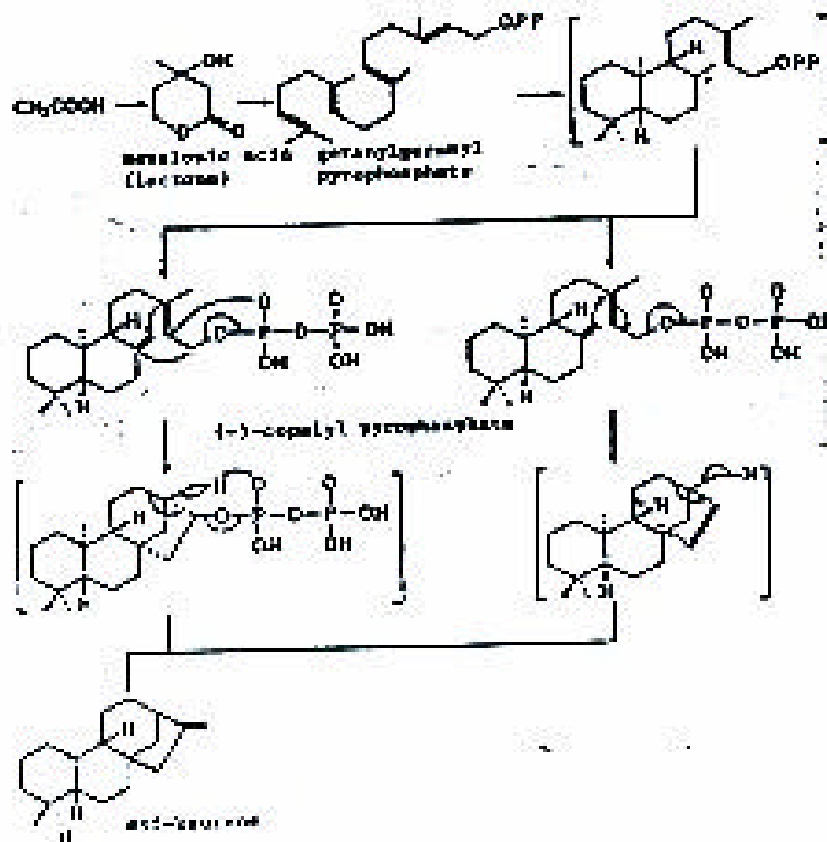


Fig. No. 48. Síntesis de ent-kaurenoil.

Nunca digas “No puedo” sin antes haberlo intentado.

No ayudes haciendo por otra persona lo que puede por si misma; sino colaborando con ella para alcanzar algo que por si misma, le resulta imposible.

Tal vez no seas el mejor, pero ello no te exime de dar siempre lo mejor de ti.